



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA LARISSA DE QUEIROZ FRANÇA

**EFEITO E SEGURANÇA DE 6,7-DIMETOXI-3-NITROCUMARINA
(COMPOSTO SEMISSINTÉTICO MODIFICADO A PARTIR DA 6,7-
DIMETOXICUMARINA OBTIDA DO CAULE DE *Platymiscium floribundum*
Vog) EM UM MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS**

SOBRAL - CE

2020

ANA LARISSA DE QUEIROZ FRANÇA

EFEITO E SEGURANÇA DE 6,7-DIMETOXI-3-NITROCUMARINA (COMPOSTO SEMISSINTÉTICO MODIFICADO A PARTIR DA 6,7-DIMETOXICUMARINA OBTIDA DO CAULE DE *Platymiscium floribundum* Vog) EM UM MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - UFC *campus* Sobral como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner.

Coorientadora: Profa. Dra. Jordânia Marques de Oliveira Freire

SOBRAL - CE

2020

ANA LARISSA DE QUEIROZ FRANÇA

EFEITO E SEGURANÇA DE 6,7-DIMETOXI-3-NITROCUMARINA (COMPOSTO SEMISSINTÉTICO MODIFICADO A PARTIR DA 6,7-DIMETOXICUMARINA OBTIDA DO CAULE DE *Platymiscium floribundum* Vog) EM UM MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - UFC *campus* Sobral como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner

Orientadora

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra Iracema Matos de Melo

Universidade Federal do Ceará (UFC-PPGCS)

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

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

F881e França, Ana Larissa de Queiroz.

Efeito e segurança de 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina (composto semissintético modificado a partir da 6,7-dimetoxicumarina obtida do caule de *platymiscium floribundum* vog) em um modelo de periodontite em ratas / Ana Larissa de Queiroz França. – 2020.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Mírna Marques Bezerra Brayner.

Coorientação: Prof. Dr. Jordânia Marques de Oliveira Freire.

1. Periodontite. 2. 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina. 3. HO-1. 4. TNF- α . 5. IL-1 β ; I. Título.
CDD 610

À Deus, o maior amor do mundo.

Aos meus pais Elizabeth e Fernando, aos
meus avós Ana e Francisco.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que ilumina e zela pelo caminho dos meus sonhos.

À minha orientadora, profa Mirna Marques por ter sido muito mais que uma docente e por se doar tanto à pesquisa, orientando como uma mãe cuidadosa cada passo de seus filhos, com paciência e sem julgamentos. Por me acolher desde o início, minha eterna gratidão e admiração.

À minha coorientadora Dra. Jordânia Freire, pelo encorajamento, positividade, apoio e disponibilidade de sempre.

À Profa. Hellíada Chaves por ser a “mãe científica” de dezenas de filhos e com um sorriso animador no rosto sempre encontrar solução para todos os problemas. Por nos ensinar a sonhar, ver a ciência em tudo e buscar o que há de melhor em nós mesmos.

À profa. Antônia Torres Pimenta pela forte parceria e por nos disponibilizar a ferramenta farmacológica do estudo.

À profa Karuza Alves pelas valiosas análises histopatológicas mesmo em tempos de tantas adversidades.

Ao prof. Dr. Vicente Pinto pelo auxílio no suprimento de insumos para a pesquisa.

Ao prof. Dr. José Roberto Viana pela gentileza no compartilhamento de materiais fundamentais para a realização de alguns protocolos experimentais.

Ao Laboratório de Genética Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS pelo suporte oferecido para o preparo dos experimentos de biologia molecular.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI por todo o suporte para a confecção do material histológico.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA por nos permitir ter acesso aos equipamentos necessários, em especial ao João Ricardo.

Ao Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC Sobral pelo suporte técnico para a confecção do material histológico.

Ao querido Anderson Weyne pela exaustiva dedicação na confecção das peças histológicas, orientações técnicas, compartilhamento de materiais de laboratório fundamentais para a pesquisa e por todo o cuidado, generosidade e entusiasmo no trabalho.

Aos técnicos do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI, Flávia de Araújo Silva e Adalberto Nascimento de Lima Júnior pelo empenho e dedicação na confecção das peças histológicas.

À técnica do Laboratório de Farmacologia de Sobral – LaFS, Nayara Alves, por todo o empenho, cuidado e conhecimentos repassados.

À veterinária do biotério Alana Gondinho pelo cuidado e zelo com os animais e por tantas vezes demonstrar empatia, carinho e disponibilidade com os alunos e suas pesquisas.

Ao prof. e amigo Jackson Costa e à amiga Moêmia Portela pela contribuição inestimável no preparo e nas análises de biologia molecular. Em tempos difíceis sempre pude contar incansavelmente com o conhecimento, paciência, bom humor e amizade de ambos. Uma conclusão em meio a todo o cenário atual: A ciência, sobretudo, são as pessoas e a vontade que elas têm de fazer tudo acontecer. Para vocês eu poderia escrever dezenas de páginas e ainda assim não seriam suficientes para expressar minha gratidão. Vocês são luz em meio ao caos.

À doutoranda e amiga Luzia Hemínia Teixeira pela condução do modelo experimental e outros diversos processos experimentais em laboratório, além do compartilhamento de seus conhecimentos e experiências adquiridos ao longo da pós-graduação.

À mestre e amiga Trycia Magalhães por compartilhar seus conhecimentos em bioestatística e por todo apoio e amizade em momentos de dúvidas.

Aos alunos de iniciação científica e pós-graduação, Iara Laís Lima, uma companheira de muito valor e competência, Maria Ester Frota, Manoel Vieira, Andréa Cacau, Caroline Olivindo, Luana Portela, Pedro Ivo Freire, Renato Freitas, João Pedro, Bianca Dutra, Tamara Sousa, Alfredo Parente, pelo compromisso e generosidade de ceder um tempo de seus dias à pesquisa.

À Ticiania Parente e ao Laboratório de Análises Clínicas de Sobral por facilitar a realização de alguns testes laboratoriais por absoluta empatia e generosidade.

À profa Iracema Melo pela gentil contribuição com seu conhecimento e experiência em momentos de dúvidas técnicas e por sempre ser pôr disponível.

Aos meus pais Elizabeth e Fernando por sempre me conduzirem pelos caminhos do bem, da honestidade, da confiança, da gratidão e principalmente da Fé. Por serem os primeiros a aplaudir minhas vitórias, segurarem minha mão durante as tribulações e apoiarem sempre todas as minhas decisões, sem fraquejar. Sem vocês eu jamais chegaria até aqui!

Aos meus avós por serem meus admiradores declarados, demonstrarem seu orgulho por mim e por tantas vezes entenderem minha ausência.

Ao intenso sonho que tenho de ser docente, que me faz buscar conhecimento e acreditar que sou capaz.

Paciência, coragem e fé.

RESUMO

A Periodontite é uma inflamação dos tecidos de suporte dos dentes com perda progressiva da inserção e destruição óssea como resultado da resposta do hospedeiro à presença de uma microbiota disbiótica. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-reabsortiva e a segurança da 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina, modificada a partir de 6,7-dimetoxicumarina obtida do caule de *Platymiscium floribundum* Vog na periodontite induzida por ligadura em ratas e o envolvimento da via HO-1 em seu mecanismo de ação. A periodontite foi induzida pela colocação de uma ligadura de fio de náilon estéril (3.0) ao redor dos segundos molares superiores esquerdos. As ratas receberam (gavagem oral) uma vez por dia, durante 11 dias 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina (0,01, 0,1 ou 1 mg / kg) ou veículo (solução salina a 0,9% + etanol a 0,1%). 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina (0,1 ou 1 mg / kg) reduziu a perda óssea alveolar ($1,88 \pm 0,15$; $1,05 \pm 0,24$, respectivamente), quando comparada ao grupo tratado com veículo ($3,05 \pm 0,30$). 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina (1 mg / kg) reduziu os níveis de RNAm de TNF- α ($2,33 \pm 0,56$) e IL-1 β ($19,87 \pm 2,9$), enquanto aumentou os níveis de RNAm de HO-1 ($43,40 \pm 1,05$) e atividade da catalase ($46,42 \pm 4,59$), quando comparado ao grupo tratado com veículo ($46,29 \pm 8,43$; $37,83 \pm 4,38$; $1,58 \pm 0,11$; $8,93 \pm 1,86$, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) nos parâmetros bioquímicos séricos (creatinina, FAT, ALT, AST) entre os grupos. 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina diminuiu a perda óssea inflamatória na periodontite induzida por ligaduras em ratas e a ativação da via HO-1 contribui pelo menos parcialmente para seus efeitos protetores.

Palavras-chave: periodontite. 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina. HO-1. TNF- α . IL-1 β .

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammation of the supporting tissues of the teeth with progressive loss of insertion and bone destruction as a result of the host's response to the presence of a dysbiotic microbiota. Thus, this study aimed to evaluate the anti-resorptive activity and safety of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin, modified from 6,7-dimethoxycoumarin obtained from the stem of *Platymiscium floribundum* in ligature-induced periodontitis in rats and the involvement of the HO-1 pathway in its mechanism of action. Periodontitis was induced by placing a sterile nylon (3.0) ligature around the left upper second molars. The rats received (oral gavage) once a day, for 11 days, 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01, 0.1 or 1 mg / kg) or vehicle (0.9% saline solution + ethanol 0.1%). 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.1 or 1 mg / kg) reduced alveolar bone loss (1.88 ± 0.15 ; 1.05 ± 0.24 , respectively), when compared to the group treated with vehicle (3.05 ± 0.30). 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg / kg) reduced levels of TNF- α (2.33 ± 0.56) and IL-1 β (19.87 ± 2.9) mRNA, while increasing HO-1 mRNA levels (43.40 ± 1.05) and catalase activity (46.42 ± 4.59), when compared to the vehicle-treated group (46.29 ± 8.43 ; 37.83 ± 4.38 ; 1.58 ± 0.11 ; 8.93 ± 1.86 , respectively). There were no statistical differences ($P > 0.05$) in serum biochemical parameters (creatinine, TALP, ALT, AST) between groups. 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin decreased inflammatory bone loss in ligature-induced periodontitis in rats and activation of the HO-1 pathway contributes at least partially to its protective effects.

Keywords: Periodontitis. 6,7- dimethoxy-3-nitrocoumarin. HO-1. TNF- α . IL-1 β .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora-1
CAT	Catalase
CSF	Fator estimulador de colônia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCG	Fluido crevicular gengival
GSH	Glutathiona reduzida
GSH px	Glutathiona peroxidase
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MIP	Macro-proteína inflamatória fágica
MMP	Metaloproteinases de matriz
NF-kb	Fator nuclear kappa beta
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
PMN	Polimorfonucleares
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
SOD	Superóxido desmutase
TLR	Receptor Toll like
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Periodontite.....	15
2.1.1	Osteoimunologia e os mecanismos celulares da perda óssea alveolar.....	18
2.1.2	Periodontite e as citocinas.....	21
2.1.3	Periodontite x estresse oxidativo.....	23
2.1.4	Heme oxigenase-1.....	25
2.2	Periodontite experimental em ratas.....	27
2.3	<i>Platymiscium floribundum</i> Vog.....	29
2.4	Cumarinas.....	31
2.5	Produtos naturais e derivados semissintéticos: alternativa para a indústria farmacêutica.....	32
3	JUSTIFICATIVA.....	34
4	OBJETIVOS.....	35
4.1	Objetivo geral.....	35
4.2	Objetivos específicos.....	35
5	CAPÍTULO I.....	37
6	CONCLUSÃO.....	66
7	REFERÊNCIAS	67
8	ANEXO A- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO “EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO DO CERNE DE <i>Platymiscium floribundum</i> VOG 6,7-DIMETOXICUMARINA E O DERIVADO SEMISSINTÉTICO 6,7-DIMETOXI-3-NITROCUMARINA EM UM MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS” PELA CEUA.....	83

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a última classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares da Academia Americana de Periodontia e da Federação Europeia de Periodontia em 2017, a periodontite é definida como “*uma doença inflamatória multifatorial crônica, associada com biofilmes de placa disbiótica e caracterizada por progressiva destruição do aparelho de suporte dentário*”. Suas principais características incluem a perda de suporte do tecido periodontal, manifestadas através de perda de inserção clínica e radiográfica, perda óssea alveolar, presença de bolsa periodontal e sangramento da gengiva (PAPAPANOU et al., 2018).

Um estudo realizado no ano de 2015, que avaliou prevalência e incidência das doenças nos últimos 25 anos, apontou que o número de pessoas com condições orais não tratadas em todo o mundo atingiu 3,5 bilhões em 2015, sendo 538 milhões de pessoas afetadas pela doença periodontal grave. Esses números provavelmente continuarão aumentando à medida que a população continua crescendo e envelhecendo (KASSEBAUM et al., 2017).

A etiopatogenia da periodontite é complexa e multifatorial, abrange a interação do biofilme bacteriano, eventos ambientais adversos, susceptibilidade genética e as respostas imunes do hospedeiro, levando a produção de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico e Espécies Reativas do Oxigênio - EROs). Esses mediadores são responsáveis pela amplificação e manutenção da resposta inflamatória culminando com a reabsorção óssea alveolar por osteoclastos e degradação das fibras ligamentares por metaloproteinases da matriz (MMPs). Tais eventos produzidos pelo hospedeiro, embora representem uma resposta de proteção, são corresponsáveis pela própria destruição tecidual que caracteriza a periodontite (SORSA et al., 2016).

Os tratamentos convencionais para periodontite baseiam-se em instruções de higiene oral, tratamento mecânico e procedimentos cirúrgicos, porém esses tratamentos isolados podem não apresentar os resultados esperados, sendo necessária a utilização de outros mecanismos terapêuticos em associação (USLU et al., 2018). Anti-sépticos locais, antibióticos sistêmicos, e agentes imunomoduladores são utilizados como terapia adjuvante (KINANE et al., 2017). Porém, o alto custo do tratamento, problemas gastrointestinais, toxicidade sistêmica e a resistência antimicrobiana criaram a necessidade de novas abordagens profiláticas e terapêuticas para periodontite (RAMS

et al., 2014; RIGHOLT et al., 2018). Nesse contexto, uma grande variedade de produtos naturais e seus derivados semissintéticos vêm continuamente sendo testados por sua capacidade de proteger os tecidos de suporte dos dentes dos processos inflamatórios crônicos (FERES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2016).

Platymiscium floribundum Vog. (*P. floribundum*) é uma árvore de tamanho médio que pertence à família Fabaceae-Papilionoideae. No Nordeste brasileiro é conhecido popularmente como “sacambu” e “jacaranda-do-litoral” e é usado na medicina popular como agente anti-inflamatório. A investigação fitoquímica deste gênero destacou os flavonóides, isoflavonas e cumarinas como constituintes principais (MILITÃO et al., 2006; CARDOSO-LOPES et al., 2008).

Do ponto de vista químico, as cumarinas, metabólitos que podem ser isolados de *Platymiscium floribundum*, exibem uma variedade de atividades farmacológicas e tornaram-se importantes compostos no desenvolvimento de pesquisas sobre drogas (WU, 2009). No entanto, quando isolados de seus organismos de origem, os constituintes de plantas podem possuir propriedades farmacológicas subótimas, incluindo alta toxicidade e características físico-químicas insatisfatórias (YÑIGEZ-GUTIERREZ et al., 2019).

Nesse contexto, faz-se necessário que a indústria farmacêutica use recursos químicos e biotecnológicos para produzir medicamentos semissintéticos derivados de produtos naturais com objetivo de ampliar a rentabilidade do produto e melhorar as características físico-químicas do composto final (YÑIGEZ-GUTIERREZ et al., 2019).

O uso de produtos semissintéticos, derivados de produtos naturais, no manejo da periodontite ainda carece de critérios pré-clínicos e estudos clínicos que possam provar sua eficácia e segurança. Neste sentido, esse estudo se propõe a investigar a eficácia e segurança do composto 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina, derivado de *P. floribundum* na periodontite experimental em ratas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Periodontite

O termo doenças periodontais abrange uma ampla variedade de condições inflamatórias crônicas da gengiva, cemento, osso e ligamento periodontal. A doença periodontal é iniciada pela gengivite, uma inflamação localizada da gengiva, causada por bactérias na placa dental, formada nos dentes e tecidos circundantes devido a má higiene oral. A gengivite tem como características marcantes o sangramento à sondagem e a vermelhidão do tecido gengival. Quando a condição inicial não recebe atenção e os tratamentos devidos, a gengivite, que é uma inflamação superficial e reversível, se estende até as estruturas periodontais mais profundas ocasionando a destruição desses tecidos denominando-se periodontite, um estágio mais grave e com consequências irreversíveis para o periodonto, podendo ter repercussões sistêmicas e afetar outros órgãos e tecidos corporais (KINANE et al., 2017).

De acordo com a nova classificação da Academia Americana de Periodontia (AAP) e Federação Europeia de Periodontia (FEP), *“a periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada com biofilmes de placa disbiótica e caracterizada por progressiva destruição do aparelho de suporte dentário”*. Suas principais características incluem a perda de suporte do tecido periodontal, manifestada através de: (i) perda de inserção clínica; (ii) perda óssea alveolar avaliada radiograficamente; (iii) presença de bolsa periodontal e (iv) sangramento gengival (PAPAPANOU et al., 2018).

Segundo a nova classificação, para que o diagnóstico de periodontite esteja correto, a perda de inserção interproximal deve estar presente em pelo menos dois dentes diferentes e não adjacentes e a perda de inserção observada não pode ser atribuída a fatores traumáticos ou não relacionados à periodontite, por exemplo, fratura radicular, infecção endodôntica, trauma cirúrgico. Resumidamente, é necessário a presença concomitante de perda de inserção clínica substancial de ≥ 3 mm e profundidade de sondagem ≥ 3 mm em pelo menos 2 dentes, abrangendo a porção vestibular-lingual (PAPAPANOU et al., 2018).

A periodontite é um grande problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, podendo levar a incapacidade e até mesmo a perda dos dentes, afetando negativamente a função, a estética e a mastigação. Além disso, é uma fonte de desigualdade social e prejudica a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Além de

gerar altos custos no atendimento odontológico (PAPAPANOU et al., 2018; HOLTFRETER et al., 2015).

A periodontite é a sexta doença mais prevalente mundialmente (NEEDLEMAN et al., 2018). Estima-se que sua forma grave afete 11% da população do mundo com prevalência aumentando conforme a idade (KASSEBAUM et al., 2014; FRENCKEN et al., 2017). Embora periodontite grave possa ocorrer ao longo da vida estima-se que sua incidência tenha picos em torno da idade de 38 anos (KASSEBAUM et al., 2014).

Além do grande impacto social e financeiro da doença, um dos maiores agravantes é o envolvimento com a saúde sistêmica dos indivíduos, visto que a maioria dos estudos transversais, caso-controle e longitudinal revelaram associações positivas entre mal estado periodontal e doença cardiovascular, controle metabólico do diabetes e partos prematuros (BECK et al., 2019).

O número de doenças e condições ligados à periodontite aumentou exponencialmente nas últimas 2 décadas. Uma revisão sistemática de 2016 das análises clínicas sobre medicina periodontal indicaram 57 condições diferentes potencialmente relacionadas à periodontite (MONSARRAT et al., 2016). Importantes pesquisas estão sendo conduzidas em outras áreas, como função excretora e reprodutiva, doenças auto-imunes, gastrointestinais, distúrbios ósseos e sanguíneos, condições neurológicas, doenças respiratórias e câncer. Recentemente, 2 publicações no *Journal of Dental Research (JDR)* estabeleceram a relação entre doença periodontal e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (TAKEUCHI et al., 2019) bem como câncer bucal (SHIN et al., 2019).

De fato, a etiopatogenia da periodontite é complexa e multifatorial, destacando o efeito da formação do biofilme dental como agente precursor para o desenvolvimento da patologia (KINANE et al., 2017). Esse processo ocorre na maioria das vezes quando a higiene oral é insuficiente, ocasionando a desorganização das colônias, aumentando o número e a diversidade de microorganismos no biofilme, o que acarreta alterações dos fatores ecológicos locais, permitindo, assim, o surgimento de novas espécies, caracterizando a disbiose bacteriana. Fatores ambientais, como o tabagismo, fatores socioeconômicos e fatores genéticos também pode estar relacionados à progressão da periodontite (KINNEY et al., 2007).

A imunidade inata é uma rede extremamente complexa e altamente regulada por células e moléculas, como citocina, quimiocinas e moléculas de adesão que funcionam

como um obstáculo inicial ao desafio bacteriano (GAFFEN et al., 2008; GRAVES, 2008).

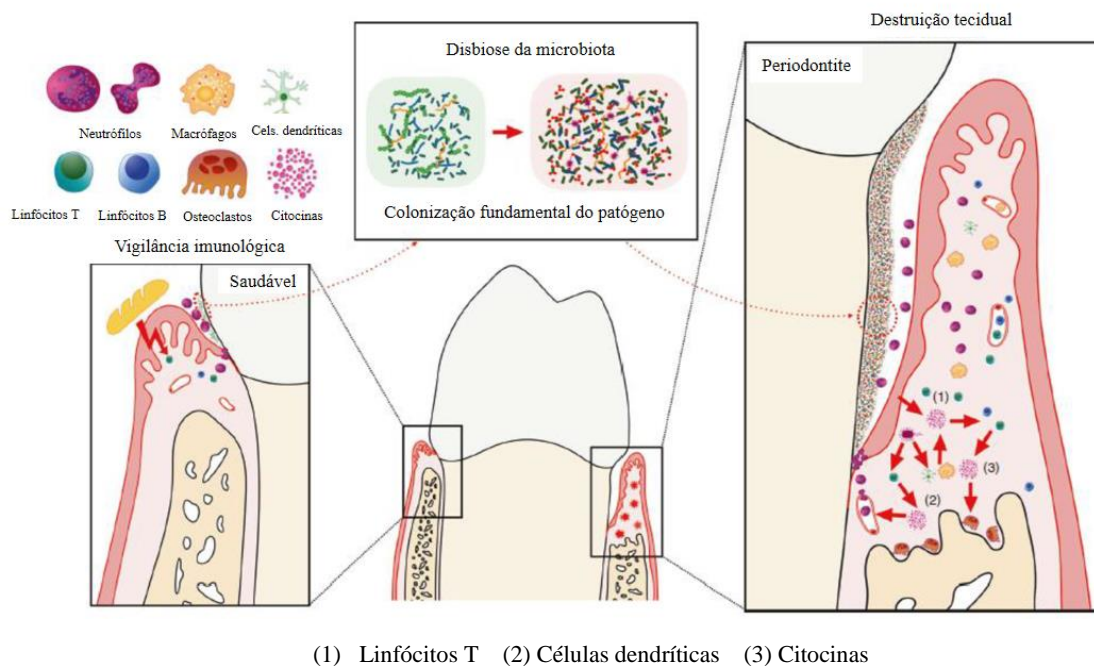
As primeiras células a chegarem ao local da infecção são os neutrófilos, seguidos de macrófagos e linfócitos que tentam fagocitar e matar as bactérias, no entanto, com a persistência do estímulo infeccioso, não conseguem inibir o processo inflamatório. Os neutrófilos são realmente o tipo predominante de leucócitos ($\geq 95\%$) na fenda gengival onde eles formam uma "parede de defesa" contra o biofilme, ostensivamente para bloquear a invasão bacteriana no tecido conjuntivo gengival subjacente (DELIMA et al., 2010; RYDER, 2010). Embora os neutrófilos forneçam homeostase na imunidade na gengiva clinicamente saudável, seus mecanismos de defesa parecem insuficientes para controlar microbiota disbiótica, apesar de sua persistência no recrutamento e capacidade de obter informações imunes e respostas inflamatórias (HAJISHENGALLIS, 2014; RYDER, 2010). Isso implica que bactérias associadas à periodontite podem escapar amplamente da morte mediada por neutrófilos em um ambiente inflamatório.

As reações adaptativas tendem a ser mais efetivas, visto que desencadeiam uma resposta imunológica com envolvimento de mecanismos celulares e não celulares direcionados aos agentes que causaram a agressão crônica. As células dendríticas de Langerhans dentro do epitélio absorvem material microbiano e o trazem para o tecido linfoide para apresentação aos linfócitos (BENAKANAKERE et al., 2012; FERES et al., 2016). Uma vez que os linfócitos chegam ao local do dano, as células B se transformam em células plasmáticas produtoras de anticorpos. A quantidade e a avidéz dos anticorpos são consideradas importantes na proteção contra a periodontite (ARANHA et al., 2013).

As células T estão envolvidas na destruição óssea da doença periodontal e podem ter grandes impactos no curso de seu desenvolvimento e/ou progressão. (KAWAI et al., 2006). As células TH1 produzem as citocinas inflamatórias, participantes na destruição dos tecidos, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1) Interleucina-6 (IL-6), além de produzir Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Prostaglandina E2 (PGE2), enquanto as células TH2 produzem citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-12). Estas respostas dependem do tipo de antígeno e da duração do estímulo podendo levar à reabsorção óssea alveolar pelos

osteoclastos, e à degradação das fibras do ligamento pelas MMPs e à formação de tecido de granulação (Figura 1) (TENG, 2003; SORSA et al., 2016).

Figura 1 – Representação esquemática do periodonto saudável e do periodonto com periodontite



Fonte: Adaptado de PAN et al., 2019. Representação do tecido periodontal saudável com resposta imunológica leve e equilibrada e da fase de transição com disbiose da microbiota patogênica, culminando para a progressão da periodontite.

2.1.1 Osteoimunologia e os mecanismos celulares da perda óssea alveolar

O osso é um tecido dinâmico, que apesar da sua aparência inerte, está em constante remodelação (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Este tecido mineralizado e especializado exerce funções importantes no organismo, tais como: locomoção, suporte e proteção de outros tecidos e órgãos e ainda serve como meio para armazenar e estocar cálcio e fósforo (BUCKWALTER et al., 1996; DOWNEY et al., 2006; DATTA et al., 2008).

Assim como os demais tecidos conjuntivos, o tecido ósseo é formado por células e uma matriz extracelular, sendo esta última constituída por matéria orgânica e inorgânica, extremamente importante para o metabolismo ósseo, além de conferir rigidez e resistência a impactos, o que é essencial para manter a integridade deste tecido (VIGUET-CARRIN et al., 2006; SANTIN, 2014). A matéria inorgânica do osso se

apresenta na forma de sais minerais de hidroxapatita fosfatada e carbonatada, enquanto o colágeno é considerado o principal componente orgânico da matriz óssea (NORDIN et al., 2001; ROSS, 2008; KIERSZENBAUM et al., 2012).

Além da matriz, as células ósseas exercem papel fundamental no metabolismo deste tecido. Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, caracterizadas pela capacidade de reabsorver matriz óssea ou dentinária. Eles são derivados principalmente de células-tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea e seus precursores mononucleares, originários da linhagem monócitos/macrófagos, são tipicamente encontrados circulando em sangue periférico (VÄÄNÄNEN, 2005). Os osteoclastos possuem morfologia e características próprias, como a formação de uma borda pregueada adjacente à matriz calcificada em reabsorção (DEGUCHI et al., 2016).

Os osteoblastos, por sua vez, são as células responsáveis pela secreção da matriz orgânica óssea, que posteriormente se calcifica formando o tecido ósseo (STEVENS et al., 2001). Com o desenvolvimento ósseo, alguns osteoblastos são aprisionados no interior da matriz e passam a ser chamados de osteócitos (UDA et al., 2017). Apesar de os osteócitos abandonarem a função de secretar a matriz, eles permanecem secretando substâncias necessárias à homeostasia óssea. Eles se adaptam à forma da lacuna e irradiam prolongamentos que formam canalículos, o que permite a comunicação entre os osteócitos, formando junções comunicantes que permitem o compartilhamento de íons, nutrientes e fluido extracelular, sendo assim responsáveis por dirigir a remodelação óssea em resposta à tensão mecânica e outros estímulos, atuando como mecanossensores e orquestradores do processo de remodelação óssea (BONEWALD, 2011; FLORENCIO-SILVA et al., 2015; UDA et al., 2017).

O tecido ósseo vive em constante processo de reabsorção e remodelação, esses processos são coordenados por atividade celular, em resposta a diversos fatores sistêmicos e locais e estresse mecânico. Esse processo de remodelagem ocorre através de ações coordenadas dos osteoclastos e dos osteoblastos que agem em porções discretas do tecido. Este processo é regulado tanto por fatores locais, quanto sistêmicos, de forma que desvios significativos neste equilíbrio resultam em reabsorção ou formação óssea aumentadas (ERIKSEN, 2010). Durante o ciclo de remodelação óssea, o osso velho e danificado é reabsorvido pelos osteoclastos, através da secreção de ácidos e enzimas proteolíticas na superfície do osso. Subsequentemente, os osteoclastos migram para a área do osso onde está havendo reabsorção e sofrem apoptose. Eles são repostos

pelos osteoblastos, os quais sintetizam nova matriz óssea. Em condições fisiológicas normais, a formação e a reabsorção óssea são fenômenos acoplados e dependentes. Este equilíbrio promove homeostase óssea incluindo a manutenção da integridade estrutural e do metabolismo do cálcio (COCHRAN, 2008).

Uma das principais características da inflamação periodontal é a reabsorção do osso alveolar ao redor do dente (CEKICI, 2014). A interação de produtos bacterianos, especialmente o LPS, com as células periodontais e imunológicas estimula a diferenciação dos osteoclastos e, assim, ativa a perda óssea patológica (GAO, 2016; TERAMACHI, 2017).

Os processos de remodelação podem ser regulados por diversas vias. A via RANK-RANKL-OPG tem sido uma das mais bem descritas (AGHALOO et al., 2011; OHE et al., 2012; EL-KHASSAWNA et al., 2017). O Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK) é um receptor da superfamília do TNF- α , que está expresso nas células precursoras de osteoclastos, enquanto o Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANKL) pode ser encontrado expresso na superfície celular de osteoblastos ou na forma solúvel (YASUDA et al., 1998; LACEY et al., 1998). A interação RANK-RANKL favorece a osteoclastogênese com consequente reabsorção óssea. A osteoprotegerina (OPG) é o regulador desse eixo. Ela é produzida especialmente por osteoblastos, e age como um inibidor natural da interação RANK-RANKL, favorecendo a síntese de matriz óssea (GRAVES, 2011).

Durante a patogênese periodontal, as bactérias periodontopatogênicas utilizam um mecanismo exclusivo para induzir a expressão do RANKL. O LPS liberado por essas bactérias gram-negativas interage com o TLR4 nas células imunes inatas, incluindo macrófagos e células dendríticas e, assim, promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 (FUJIHARA et al., 2003; WATANABE et al., 2011; DÍAZ-ZÚNIGA et al., 2015; SILVA et al., 2015). Essas citocinas podem estimular a expressão de RANKL em osteoblastos (TAUBMAN et al., 2005; HOFBAUER et al., 1999). Também a secreção de TNF- α pode estimular as células T e B a produzirem RANKL (ALGATE et al., 2016; KAWAI et al., 2006). O LPS também pode interagir com os osteoblastos através do TLR4 estimulando a expressão de RANKL (KIKUCHI et al., 2001). Além disso, os fibroblastos do ligamento periodontal podem aumentar ainda mais a secreção de RANKL após a exposição ao LPS bacteriano. RANKL produzido durante patogênese periodontal se liga

a RANK, um receptor expresso em células precursoras de osteoclastos (NAGASAWA et al., 2007; HIENZ et al., 2015).

Nesse contexto, o eixo RANK/RANKL/OPG é estimulado ou inibido por diferentes mediadores, sendo a reabsorção óssea facilitada na presença de mediadores inflamatórios como as interleucinas-1 β (IL-1 β), IL-6, e o TNF- α , uma vez que estes aumentam a expressão de RANKL e diminuem a expressão de OPG (NAKASHIMA et al., 2000). O aumento de citocinas não está relacionado ao aumento da reabsorção óssea somente por facilitar a interação RANK/RANKL, mas também por aumentar a produção de Fator Estimulador de Colônia (CSF), como tem sido descrito para o TNF- α (ZHAO et al., 2016).

2.1.2 Periodontite e as citocinas

Citocinas são moléculas protéicas secretadas pelas células do sistema imunológico que podem regular múltiplas funções na resposta imune e se ligam a receptores específicos para enviar diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células desse sistema (MOULTON, 2016).

São produzidas por diversas células, principalmente por linfócitos T e macrófagos, e agem como moduladores envolvidos na homeostase imunológica, regulando a resposta inflamatória e promovendo o controle efetivo dos patógenos (LINS et al., 2007; CHRISTIAN et al., 2012; CEKICI et al., 2014). Além disso, as citocinas estimulam as células alvo a produzir mais citocinas, amplificando a cascata da resposta imune-inflamatória (ZHANG et al., 2007). Elas atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica (VARELLA et al., 2001).

No que se refere à periodontite, quando a patogenicidade da microbiota local é elevada, os produtos bacterianos, representados pelo lipopolissacarídeo (LPS) ativam exarcebadamente o sistema imunológico do hospedeiro, liberando as primeiras ondas da secreção de citocinas e então a resposta de destruição do tecido é iniciada. A importância dessas moléculas advém do fato de que elas participam principalmente da amplificação da cascata de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento, ativação e diferenciação de células imunes específicas (HAJISHENGALLIS, 2015; PAN et al., 2019).

Merecem destaque especial, as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α , que são as primeiras citocinas a surgirem na resposta inata e agirem diretamente na osteoclastogênese, estimulando a reabsorção óssea e inibindo sua formação (CEKICI et al., 2014; GARLET, 2010). Essas citocinas têm efeitos pleiotrópicos na promoção de linfócitos e destruição tecidual (PAN et al., 2019).

Os componentes da família IL-1 estão envolvidos em respostas imunes inatas e adaptativas e comprovadamente relacionados à inflamação, autoimunidade, distúrbios cardiovasculares e câncer. A família IL-1 é composta de 11 moléculas e 10 receptores associados (MIROUSE et al., 2018). Dentre suas principais funções podemos citar: ativação de fatores transcricionais relacionados a inflamação como Fator Nuclear (NF-Kb) e proteína ativadora 1 (AP-1) (YANG et al., 2018), Indução ampla da expansão e ativação de células Th1, Th2 e células natural killer (Células NK) e por fim, estimulação da expressão de MMPs e perda óssea inflamatória na periodontite (ISHIHARA et al., 1997).

A IL-6 apresenta 10 membros e foi identificada e nomeada há quase 30 anos. Pesquisas já identificaram vários membros desta família e determinaram suas funções pleiotrópicas no sistema imunológico. Na inflamação, apresenta um papel fundamental regulando a resposta imune, hematopoese e resposta de fase aguda (SEHGAL et al., 1989; HASEGAWA et al., 2016; JONES et al., 2018; MURAKAMI et al., 2019). O envolvimento da IL-6 na periodontite é bem reconhecido. O modelo experimental de macaco para periodontite revelou que a expressão de IL-6 é induzida na fase de iniciação, mas permanece baixa nas fases de progressão e resolução da periodontite. Esses resultados indicaram que a IL-6 desempenha um papel crucial principalmente na iniciação e fase aguda da periodontite (EBERSOLE et al., 2014).

O TNF foi reconhecido e nomeado pela primeira vez em 1975 como Fator de necrose tumoral (CARSWELL et al., 1975). Os dois membros da família TNF, TNF- α , de maior interesse na patogênese da periodontite e TNF- β , foram purificados e identificados na década de 1980 e compartilham o mesmo receptor de membrana. Além de induzir a morte celular, o TNF atua como um fator crucial na resposta pró-inflamatória e comunicação celular (AGGARWAL, 1984; AGGARWAL, 1985a; AGGARWAL, 1985b).

Essa proteína, TNF- α , é secretada por macrófagos, mas também por células NK, mastócitos, linfócitos T e B. TNF- α solúvel, quando secretada após o estímulo antigênico, é capaz de se ligar aos seus receptores de membrana TNFR1 e TNFR2 e ambos ativam fatores transcricionais representados por NF-Kb, através de uma cascata de sinalização distinta. O TNFR1 é amplamente expresso na maioria células de mamíferos, enquanto a expressão do TNFR2 é restrita a células imunes e endoteliais (FAUSTMAN et al., 2010).

De acordo com Ding em 2014, vários polimorfismos na região promotora do TNF- α foram identificados e podem contribuir para a suscetibilidade da periodontite (DING et al., 2014). Embora TNF- α seja detectada em tecido gengival clinicamente saudável, na periodontite esses níveis apresentam-se consideravelmente mais elevados no fluido crevicular gengival (FCG) e no soro (MADUREIRA et al., 2018; GÓRSKA et al., 2003; YUCCEL-LINDBERG et al., 2013). Esses resultados podem ser explicados pela participação do TNF- α no metabolismo ósseo e estudos demonstraram que essa citocina regula positivamente a expressão de RANKL em células epiteliais gengivais, células T e osteoblastos (FUJIHARA et al., 2014; KAWAI et al., 2006).

Além disso, foi relatado que o TNF- α medeia a apoptose das células epiteliais e conjuntivas e inibe a produção da matriz extracelular de fibroblastos gengivais, indicando que o TNF- α pode estar envolvido no início da periodontite, prejudicando a barreira mucosa da via oral (ARANCIBIA et al., 2013; BASSO et al., 2016).

2.1.3 Periodontite e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição que descreve um estado potencialmente causado por radicais livres – produção excessiva de oxigênio livre proveniente da oxidação de substratos tais como açúcares, gorduras e proteínas glicadas. É decorrente de um desequilíbrio persistente entre a produção de espécies moleculares altamente reativas (oxigênio e nitrogênio) e defesas antioxidantes, levando a um dano celular. Os radicais livres tentam ganhar estabilidade capturando um elétron adicional de estruturas moleculares à sua volta. A molécula doadora que perde um elétron neste processo de oxidação-redução é denominada oxidada e tem a capacidade de oxidar outras moléculas causando um dano às células vizinhas (DAHIYA et al., 2013).

As células polimorfonucleadas ativam mecanismos oxidativos que matam bactérias fagocitadas produzindo EROs, incluindo radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH) e ácido hipocloroso (HClO). Além de matar bactérias patogênicas, essas moléculas causam danos aos tecidos por processo de oxidação (CHIU et al., 2017).

Quando presentes em baixas concentrações, os radicais livres mostram efeitos benéficos na resposta celular e na função imunológica. O desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes resulta na indução de danos celulares, denominado como estresse oxidativo (LIOCHEV, 2013). O estresse oxidativo induz muitas alterações patológicas, incluindo inflamação e câncer (LI et al., 2015).

Num primeiro momento, apenas características negativas foram atribuídas às EROs, sendo reconhecido o seu envolvimento na etiologia de muitas doenças, especialmente as associadas com o envelhecimento. Sob condições normais, os compostos de EROs são neutralizados na célula pela ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH Px), e também antioxidantes não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH) e vitaminas C e E (DAHIYA et al., 2013; TRIVEDI et al., 2017).

Quando esse equilíbrio é interrompido e as células estão sob estresse oxidativo, há uma ativação de enzimas que eliminam radicais livres para neutralizar os efeitos tóxicos das EROs, que incluem danos ao DNA, lipoxigenase, oxidação de aminoácidos e inativação de enzimas atribuíveis à oxidação de cofatores (MAIS et al., 2011). Para combater esses efeitos deletérios, níveis elevados das EROs induzem aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como GPx, SOD e CAT. Essas enzimas fazem parte do mecanismo que protege as células contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (OKTAY et al., 2015).

Evidências crescentes indicam que a periodontite induz a produção excessiva de EROs no tecido periodontal. Estudos clínicos mostraram que a doença está correlacionada com o aumento da peroxidação lipídica no fluido crevicular gengival e na saliva (BALTACIOGLU et al., 2014; TSAI et al., 2005). Com a progressão da periodontite, as EROs produzidas como resultado da inflamação periodontal se difundem na corrente sanguínea provocando a oxidação de várias moléculas no sangue, levando ao estresse oxidativo circulante, que pode atingir gradualmente múltiplos

órgãos. Portanto, o aumento do estresse oxidativo circulante induzido pela periodontite pode afetar negativamente a saúde sistêmica (TOMOFUJI et al., 2007).

Neste cenário, é importante destacar os fitoquímicos, produtos do metabolismo secundário das plantas, selecionados ao longo da evolução, que são estocados nos seus tecidos. A atividade antioxidante, presente em algumas plantas e frutos comumente utilizados pela população, já foi evidenciada na literatura (WINK, 2018).

Haja visto a importância dos produtos naturais na gestão do estresse oxidativo, estudos recentes do nosso grupo comprovaram que a periodontite induzida por ligadura em ratos levou a uma redução significativa dos níveis de SOD e CAT no tecido gengival. Por outro lado, esse efeito foi estatisticamente reduzido em animais tratados com *Stemmodia maritima*, o que sugere que os efeitos benéficos desse fitoterápico estão pelo menos parcialmente relacionados às suas propriedades antioxidantes, resultando na melhora da inflamação periodontal. (TEIXEIRA et al., 2017).

Muitos resultados descritos na literatura impulsionam a investigação de compostos naturais, isolados e semissintéticos que possam auxiliar em tratamentos auxiliares na resolução da inflamação, através da homeostase das EROs.

2.1.4 Heme oxigenase-1

A lesão celular provocada pela inflamação e pelo estresse oxidativo parece desempenhar um papel central em diversos processos patológicos. As células, em contrapartida, possuem uma série de genes protetores cuja expressão preserva a estrutura e as funções celulares em ambientes nocivos. Um desses genes é o que codifica a heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima que degrada a molécula de heme, produzindo monóxido de carbono (CO), biliverdina (BV) e ferro livre. A HO-1 e seus produtos vêm sendo alvo de pesquisas, por suas notáveis propriedades biológicas e pelos possíveis potenciais terapêuticos para doenças inflamatórias (RYTER., 2019; WAZA et al., 2018).

A expressão de HO-1 é praticamente indetectável na maioria das células em condições fisiológicas, mas em condições de estresse é uma enzima altamente indutível, cuja regulação positiva da transcrição ocorre devido a uma ampla gama de exposição a estímulos nocivos para as células, como a hipóxia, endotoxinas e EROs e é entendida

como uma estratégia utilizada pelas células para neutralizar uma variedade de condições de estresse (KEYSE et al., 1989; RYTER et al., 2006).

O mecanismo de proteção da enzima HO-1 está longe de ser completamente desvendado e permanece apenas parcialmente conhecido, mas um dos pontos-chave relatados na literatura tem sido o seu envolvimento como agente anti-oxidante sob a molécula de heme. A molécula de heme é constituída por uma estrutura anelar complexa que está envolvida em processos biológicos como o transporte de oxigênio (hemoglobina), respiração celular (citocromos), transdução de sinal (guanilato ciclase) e detoxificação de drogas (citocromo p450) (PONKA, 1999). Apesar de sua importância fisiológica, o acúmulo excessivo de heme livre (dissociado de proteínas) pode ser nocivo para o organismo, por sua capacidade de gerar estresse oxidativo e lesar diretamente membranas lipídicas e organelas celulares (KNIGHT et al., 2004). Como um reflexo de sua citotoxicidade e por atuar diretamente como um sinal endógeno de alerta para o sistema imune, heme livre é um potente estímulo deflagrador de processos inflamatórios (GRACA-SOUZA, et al., 2002).

Uma série de mecanismos foi desenvolvida para impedir ou minimizar esses efeitos tóxicos. No ambiente intracelular, o principal mecanismo de detoxificação de heme é a sua degradação pela enzima microssomal heme oxigenase. Essa reação se dá pela quebra do anel porfirínico de heme, gerando quantidades equimolares de BV, CO e ferro. Esses produtos de reação podem exercer potentes propriedades anti-oxidantes *in vitro* e citoprotetoras *in vivo* (RYTE, 2019).

O mecanismo de degradação de heme empregado pelo HO-1 é um método eficaz de suprimir a desregulação da oxidação, resposta imune inadequada e outros distúrbios e doenças relacionadas ao estresse oxidativo (WAZA et al., 2018). No entanto, além do substrato heme, um amplo espectro de estímulos nocivos pode induzir a expressão de HO-1, tais como agentes que incluem óxido nítrico (NO), citocinas, LPS, metais pesados, hormônios, fatores de crescimento, substâncias reativas ao tiol, oxidantes, lesão por hipóxia / hiperóxia, isquemia / reperfusão e radiação ultravioleta-A, entre outras causas (RYTER et al., 2006).

A ação anti-inflamatória e anti-oxidante de seus produtos de quebra CO, BV/BR e Ferro podem contribuir para a melhoria da inflamação, inibindo o LPS bacteriano,

reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (OTTERBEIN et al., 2000), reduzindo a adesão de leucócitos ao endotélio vascular por modificação estrutural (HAYASHI et al., 1999), bem como pela capacidade de modular a atividade de fatores de transcrição como NF-Kb e AP-1, que levam a diferentes propriedades protetoras (INOUE et al., 2001; NDISANG et al., 2009).

Além dos efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes, estudos apontam evidências que HO-1 pode atuar como neuroprotetor prevenindo a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, protegendo a função renal e hepática e ainda pode ter envolvimento com a secreção de insulina em diabéticos, melhorando o controle glicêmico (CHEN et al., 2010; CHEN, 2014; YET et al., 2001; WANG et al., 2010; MCNALLY et al., 2006; TIWARI et al., 2014; LEE et al., 2011). Por outro lado, foi observado que a enzima HO-1 por conferir aumento da sobrevivência das células e suprimir as vias apoptóticas, podendo levar a proliferação celular descontrolada e progredir doenças como câncer e distúrbios neurodegenerativos (ABDALLA et al., 2015; NITTI et al., 2017).

Em 2015, Li e colaboradores realizaram um estudo que apontou que a transfecção de HO-1 foi capaz de inibir danos em osteoblastos induzidos por etanol e esses resultados sugerem que HO-1 desempenha um papel protetor nos osteoblastos, e a transfecção de HO-1 pode inibir efetivamente os danos ósseos induzidos pelo etanol (LI et al., 2015).

Na periodontite, relatos de Souza e colaboradores (2018) mostraram que a enzima HO-1 apresentou ação protetora no osso alveolar em animais com periodontite demonstrando a importância da enzima na modulação inflamatória e consequente redução de seus danos em doenças crônicas.

2.2 Periodontite experimental em ratas

Os modelos animais são usados para avaliar a etiopatogenia, características clínicas, aspectos histológicos e imunológicos das doenças, além disso, devem possibilitar a validação de hipóteses e comprovar a segurança e a eficácia de novos tratamentos (STRUILLON et al., 2010). Diferentes espécies animais podem ser usadas

para modelar doenças e testar suas possíveis terapêuticas, mas primatas, cães, ratos, coelhos, porcos, hamsters e furões são os mais comumente empregados (TOBITA et al., 2008; MADDEN et al., 1994). Contudo, é válido enfatizar que, independente da espécie usada, sempre os protocolos experimentais devem ser conduzidos assegurando-se os princípios éticos da experimentação envolvendo animais não humanos e as boas práticas em laboratório.

Os roedores são os animais mais amplamente estudados nos experimentos pré-clínicos envolvendo patologias periodontais devido suas vantagens como o porte, menor custo, controle da idade e especificidades genéticas, além da microbiota controlável e facilidades de manipulação. Dentre os roedores, o rato (*Rattus norvegicus albinus*) é o mais adequado para estudos microbiológicos e imunológicos (STRUILLOU et al., 2010). Possui características anatômicas da junção dento alveolar da região dos seus molares mais semelhantes com a descrita no homem, apesar da diferença na queratinização do epitélio crevicular (LISTGARTEN, 1975). A doença nessa espécie animal pode ser induzida de diversas formas, tais como, por meio de manipulação dietética (LALLAM-LAROYE et al., 2006), através da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos e ainda, por meio da colocação de ligaduras na região cervical dos molares (BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000; HAJISHENGALLIS, 2014b).

No modelo de ligadura em ratos, o objetivo é facilitar o desenvolvimento de uma microbiota oral disbiótica e danificar o tecido gengival. O modelo de ligadura é um dos modelos amplamente utilizados para iniciar a doença periodontal experimental por apresentar diversas características como a previsibilidade do tempo de início da doença, as significativas respostas inflamatórias do hospedeiro, perda óssea alveolar, ambiente definido e um curto período de tempo para desenvolvimento da doença (ABE et al., 2013; GLOWACKI et al., 2013; KAJIKAWA et al., 2017). Mesmo com essas inúmeras vantagens, vale salientar que nenhum modelo disponível até o momento é adequado para o estudo de todos os aspectos da doença periodontal humana (MARCHESAN et al., 2018).

Os achados clínicos e microscópicos da periodontite induzida em ratos são quase semelhantes àqueles observados no homem, com sangramento gengival e alterações graduais no epitélio juncional, como formação de cristas epiteliais, ulceração e migração apical. Observa-se ainda, no tecido conjuntivo subjacente, infiltrado

inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos, bem como destruição de fibras colágenas e atividade osteoclástica aumentada (HENNEMAN et al., 2012).

Uma vez definido o método de indução da periodontite experimental, uma série de estudos pode ser realizada com relação à sua patogênese, evolução e terapêutica. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos utilizando um modelo experimental em ratos em que periodontite pode ser induzida, reproduzida e averiguada por meio da colocação de ligadura na cervical do segundo molar superior esquerdo (BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000; MARTINS et al., 2016). Neste modelo, a ligadura atua como um trauma mecânico sobre a área dento-gengival reduzindo assim a integridade do tecido, facilitando o acúmulo do biofilme dental e permitindo que haja interação entre biofilme polimicrobiano e o hospedeiro, induzindo a perda óssea alveolar que tem início 3 dias após a indução, atingindo um máximo entre os dias 7 e 11, e declinando no dia 14. Entretanto, embora nesse modelo a perda óssea apresente uma redução aos 14 dias, o dano tissular é irreversível, comprometendo a fisiologia do sistema estomatognático (LIMA et al., 2000).

Este modelo representa uma importante estratégia para o estudo da fisiopatologia da reabsorção óssea *in vivo*, uma vez que é possível quantificar a perda óssea diretamente, permitindo avaliar os efeitos de ferramentas farmacológicas que possam interferir nesse processo destrutivo, contribuindo para a compreensão dos fenômenos inflamatórios envolvidos no mecanismo de lise óssea e a busca de tratamentos que possam alterar o curso evolutivo de doenças ósseas inflamatórias, como a periodontite (OZ et al., 2011).

2.3 *Platymiscium floribundum* Vog

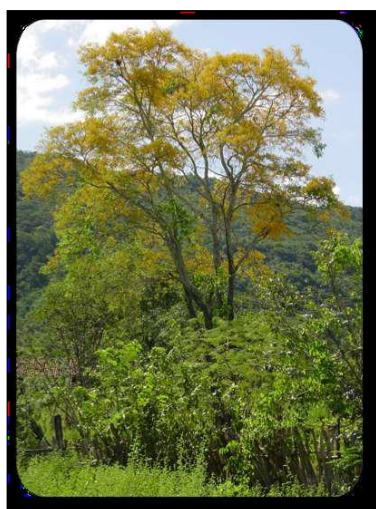
O gênero *Platymiscium*, pertencente à família Fabaceae (ou Leguminosae) e foi estabelecido por Vogel em 1837, é um gênero pequeno, contendo 33 espécies com distribuição restrita nas Américas. Quatro espécies são morfologicamente variáveis e geograficamente difundidas, e 15 espécies são mais restritas, sendo algumas endêmicas muito estreitas. O *Platymiscium* é endêmico dos neotrópicos e amplamente distribuído do México ao sul do Brasil e da Bolívia. A química deste gênero está limitada à investigação fitoquímica de apenas quatro espécies e até agora revelou flavonóides,

isoflavonas e cumarinas como principais constituintes (CARDOSO-LOPES et al., 2008).

Dentre as espécies pertencentes a esse gênero destaca-se *Platymiscium floribundum* Vog (Figura 2), conhecida popularmente por sacambú, jacarandá do litoral, jacarandá-rosa e jacarandá-vermelho, que é uma espécie característica da floresta pluvial da encosta atlântica, que, devido à intensa floração com coloração amarela, pode ser utilizada como planta ornamental e no paisagismo como também em reflorestamentos mistos, reposição de áreas degradadas e de preservação permanente, pois habita quase que exclusivamente o interior da floresta primária densa, nas planícies aluviais, várzeas úmidas e início de encostas. Sendo também utilizada pela população local para fins medicinais como agente anti-inflamatório, e a sua madeira tem valor comercial em carpintaria (FALCÃO et al., 2005; LORENZI, 2009). Recentemente um estudo realizado por nosso grupo comprovou o efeito anti-inflamatório, anti-reabsortivo e anti-oxidante do extrato clorofórmico de *Platymiscium floribundum* na periodontite experimental em ratas (FREIRE et al., 2019).

O estudo químico de *Platymiscium floribundum* Vog revelou que os isoflavonóides são a primeira classe com maior número de compostos, com um total de dez identificados. Investigações químicas revelaram que esses isoflavanoídes possuíram atividade contra células cancerosas, apoptose em células HL- 60 de leucemia humana (MILITÃO et al., 2006), além de atividade antifúngica e acetilcolinesterásica (CARDOSO-LOPES et al., 2008).

Figura 2. Ilustração de *Platymiscium floribundum*

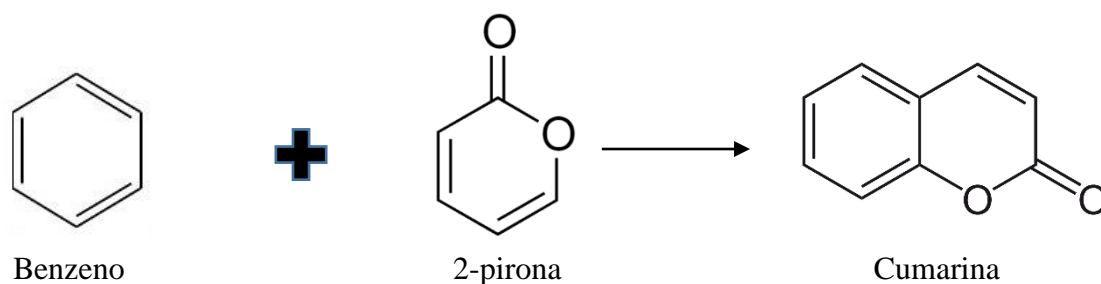


2.4 Cumarinas

As cumarinas ($C_9H_6O_2$) são metabólitos secundários que podem ser encontradas em diversos vegetais como frutas cítricas, tomates, leguminosas, chá verde (BILGIN et al., 2011). Esses metabólitos apresentam atividades biológicas anti-inflamatórias, anti-coagulantes, antibacterianas, antifúngicas, anti-virais, anticâncer, anti-hipertensivas, anticonvulsivantes, anti-adipogênicos, antioxidantes e propriedades neuroprotetoras. (KOSTOVA, 2007; ZHENG et al., 2013; VENUGOPALA et al., 2013).

As cumarinas resultam da fusão de benzeno (C_6H_6) e um anel de 2-pirona ($C_5H_4O_2$) (figura 2). Na natureza, o anel heterocíclico é oxigenado em C-7 e menos frequentemente em C-5, C-6 e C-8 (BARTON et al., 1979). Em geral, pode se estabelecer que essa família exibe permeabilidade à membrana celular, que são características comuns encontradas na maioria dos medicamentos disponíveis atualmente (GALKIN et al., 2009). As cumarinas são caracterizadas por baixo peso molecular, fácil síntese e alta biodisponibilidade, bem como uma variedade de atividades farmacológicas (WU et al., 2009), visto que, a toxicidade das cumarinas e seus derivados é baixa (KONG et al., 2012). A relação entre seus efeitos farmacológicos e estrutura química são a base clínica da droga. Portanto, tornou-se uma prioridade para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos estudar compostos de cumarina que possam exercer efeito terapêutico (IRANSHAHI et al., 2009).

Figura 3- Estrutura química do Benzeno, da 2-pirona e das cumarinas



Fonte: Adaptado de Wikipedia.org. Representação esquemática das estruturas químicas do benzeno e da 2-pirona, que quando fusionados originam as cumarinas.

Esse composto pode ser encontrado em diferentes espécies vegetais, como por exemplo, em *Campylotropis hirtella*, *Ruta graveolens*, *Derris scandens* e *Psoralea corlifolia*. As cumarinas também são encontradas em *Platymiscium floribundum*, onde podemos citar a 6,7-dimetoxicumarina, também conhecido como escaporona (FALCÃO, 2003).

2.5 Produtos naturais e derivados semissintéticos: alternativa para a indústria farmacêutica

O tratamento por meio de plantas medicinais, denominado de fitoterapia, não é recente (GUYOT, 1990; BETTEGA et al., 2011). Durante séculos, as fontes de medicamentos eram inteiramente de origem natural, preparados, principalmente, a partir de ervas e plantas medicinais, constituindo a fonte mais antiga para o tratamento e a cura de doenças, simbolizando, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades (BRAZ-FILHO, 2010). Um estudo realizado pela SOS FARMA, nas regiões do Brasil revelou que 91,9% das famílias utilizam plantas com fins terapêuticos e que 46,6% destas famílias cultivam essas plantas em seus próprios quintais (MARTINS et al., 2012). Segundo alguns autores, das 1.328 novas entidades químicas aprovadas como drogas entre 1981 e 2016, apenas 359 eram puramente de origem sintética e um pouco menos da metade desses novos medicamentos eram de origem natural ou derivadas inspiradas em compostos naturais (NEWMAN et al., 2016).

A classificação dos produtos de origem natural é dividida em três categorias: produtos naturais (puros) inalterados; mistura de produtos naturais e produtos naturais derivados e isolados de plantas ou outros organismos vivos como fungos, esponjas, líquenes ou microorganismos e, por último, produtos modificados pela química medicinal. De fato, os produtos naturais são as fontes primárias e majoritárias de muitos medicamentos difundidos em todo o mundo e a indústria farmacêutica não poderia oferecer alternativas tão eficazes e diversas caso não fizesse o uso benéfico e racional dessas fontes. Nesse cenário, a descoberta de medicamentos à base de fitoconstituintes introduziu com sucesso moléculas importantes de drogas como artemisinina e taxol, medicamentos amplamente difundidos, para tratar a malária e câncer, respectivamente (ROSS, 1999).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria

farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (MONTELLANO, 1975; UNANDER et al., 1995).

O rico e poderoso leque de atividades biológicas encontrados nos produtos naturais, com destaque nas plantas, deve-se à produção de metabólitos secundários, moléculas complexas que são o resultado da ativação de vias e enzimas muito específicas, produzidas no metabolismo da planta como forma adaptativa ao ambiente e condições da natureza, que ajudam a lidar melhor com as pressões bióticas e abióticas (ZHAO et al., 2019). Esses metabólitos apresentam grande diversidade química estrutural, e de fato não são facilmente sintetizados pela indústria química. Assim, as plantas ainda são as responsáveis por grande parte da produção dos metabólitos secundários que conhecemos hoje, como os flavonóides, alcalóides, cumarinas, entre outros, que já tiveram diversas atividades terapêuticas reveladas (HENZ RYEN et al., 2019).

A arquitetura molecular complexa e a alta densidade funcional de produtos naturais são responsáveis por sua seleção, e acontecem devido a potentes interações com uma ampla variedade de alvos moleculares, de aspectos clinicamente relevantes. Essas propriedades contribuem para a grande proporção de produtos farmacêuticos à base de produtos naturais na clínica (NEWMAN et al., 2016). No entanto, quando isolados de seus organismos de origem, os produtos naturais às vezes possuem propriedades farmacológicas subótimas, incluindo alta toxicidade, farmacocinética deficiente, metabolismo rápido, baixa solubilidade ou pouca estabilidade da substância química, o que poderia acarretar prejuízos significantes para as pessoas que fazem o seu uso (YÑIGEZ-GUTIERREZ et al., 2019).

Outro desafio enfrentado pela indústria no desenvolvimento de medicamentos puramente extraídos e isolados das plantas, seria a pequena quantidade na qual os compostos naturais bioativos geralmente se acumulam nos tecidos vegetais, que acarretariam a baixa rentabilidade de produtos farmacológicos. Nesse contexto, fez-se necessário que a indústria farmacêutica usasse de recursos químicos e biotecnológicos para produzir, em larga escala, medicamentos semissintéticos e sintéticos derivados de produtos naturais, ampliando a rentabilidade do produto e melhorando as características físico-químicas do produto inicial extraído e isolado de sua planta original (YÑIGEZ-GUTIERREZ et al., 2019).

Está claro que a semisíntese e a síntese total de moléculas surgiu como uma ferramenta para promover modificações estruturais, a fim de modular as propriedades biológicas destes produtos puramente naturais (KINGSBURY et al., 1991). Nesse sentido, deve-se enfatizar que parte do interesse em descobrir tais estruturas com atividades biológicas, reside na capacidade de usar química medicinal para traduzir tais estruturas complexas em moléculas mais simples, a fim de obter novos compostos passíveis de aplicação para produção industrial, e que fosse capaz, a partir de um conjunto de técnicas, de multiplicar grandes quantidades do produto final desejado, através de novas abordagens (RODRIGUES et al., 2016; YÑIGEZ-GUTIERREZ et al., 2019).

Nos últimos anos, moléculas derivadas de plantas são apontadas como uma importante fonte de medicamentos com ações anti-inflamatórias, que parecem modular o desequilíbrio do sistema imunológico, além disso, os produtos naturais derivados de plantas são alternativas seguras, eficazes, biocompatíveis e renováveis (UDDIN, 2014), sendo interessante para tratar doenças associadas ao metabolismo ósseo, a exemplo da periodontite, despertando o crescente interesse para a investigação de seus mecanismos e vias de ação.

3 JUSTIFICATIVA

A periodontite ainda é a principal causa de perda de dentes em adultos e fator de risco para diversas doenças, exigindo intervenções terapêuticas (SANZ; VAN WINKELHOFF, 2011). O tratamento convencional da periodontite consiste em instruções de higiene oral, tratamento mecânico e procedimentos cirúrgicos, com uso de medicação local (colutórios a base de clorexidina, por exemplo), considerados como padrão ouro e que são eficazes para a maioria dos pacientes. Entretanto, a despeito de uma terapia periodontal diligente, alguns pacientes ainda continuam a apresentar atividade da doença (USLU et al., 2018). Nesses casos a introdução de fármacos por via sistêmica (antibióticos, agentes imunomoduladores) pode trazer algum ganho clínico (KINANE et al., 2017). No entanto, os graves efeitos colaterais associados ao uso desses fármacos, que incluem toxicidade gastrointestinal e renal, resistência antimicrobiana, acabam limitando essa opção para aqueles pacientes refratários à terapia convencional. Esse cenário representa um terreno fértil para pesquisas por novas abordagens profiláticas e terapêuticas para o manejo da periodontite na clínica

odontológica (RAMS et al., 2014; RIGHOLT et al., 2018). Nesse contexto, uma grande variedade de produtos naturais e seus derivados semissintéticos vem continuamente sendo testados por sua capacidade de proteger os tecidos de suporte dos dentes dos processos inflamatórios crônicos (OLIVEIRA et al., 2016; FERES et al., 2018;).

A utilização de plantas medicinais e seus produtos derivados simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, que não dispõe de amplo acesso aos serviços de saúde e adaptam-se ao tratamento com os recursos possíveis e disponíveis para uma melhor qualidade de vida (VAL et al., 2012). Dessa forma, os compostos obtidos de plantas configuram-se como uma alternativa de terapia anti-inflamatória e anti-oxidante para a periodontite. No entanto, é importante que ensaios pré-clínicos e clínicos avaliem a possível eficácia e segurança desses compostos, uma vez que o fato de ser obtido de uma planta não é credencial de eficácia e nem tampouco de segurança.

Desta forma, esse estudo tem como objetivo avaliar em um ensaio pré-clínico de periodontite em ratas a eficácia e segurança de um composto semissintético (6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina) obtido de *Platymiscium floribundum* Vog, visto que a eficácia e segurança do extrato dessa planta já foi testada e comprovada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (FREIRE et al., 2020).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antirreabsortivo e a toxicidade do derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina na progressão da periodontite em ratas.

4.2 Objetivos específicos

- Obter o composto derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina, a partir da modificação de 6,7-dimetoxicumarina obtida do caule de *P. floribundum*;
- Analisar o efeito do derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina sobre a perda óssea alveolar;

- Analisar o efeito do derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina sobre a atividade de catalase no tecido gengival;
- Identificar o efeito do derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina sobre os níveis de RNAm de TNF- α , IL-1 β e HO-1 no tecido gengival;
- Examinar a toxicidade do derivado semissintético 6,7-dimetoxi-3-nitrocumarina em ratas submetidas à indução da periodontite e tratadas durante 11 dias;

5. CAPÍTULO I

Semisynthesis and evaluation of the antiresorptive activity of the 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin obtained from *Platymiscium floribundum* stems in the ligature-induced periodontitis in rats: the involvement of the HO-1 pathway

Artigo submetido ao periodico *Pharmacological Research*
(Qualis A1 em Medicina II/ Fator de Impacto 5.893)

5.1 ARTIGO 1

Semisynthesis and evaluation of the antiresorptive activity of the 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin obtained from *Platymiscium floribundum* stems in the ligature-induced periodontitis in rats: the involvement of the HO-1 pathway

- Abstract word count: 214 words
- Total number of figures: 3 figures
- Number of references: 37 references
- Keywords: Periodontitis, 6,7- dimethoxy-3-nitrocoumarin; HO-1; TNF- α ; IL-1 β ,

1 **Semisynthesis and evaluation of the antiresorptive activity of the 6,7-dimethoxy-3-**
2 **nitrocoumarin obtained from *Platymiscium floribundum* stems in the ligature-**
3 **induced periodontitis in rats: the involvement of the HO-1 pathway**

4 Ana Larissa de Q. França^a, Hellíada V. Chavesa, ^{b, d}, Jordânia M. de O. Freire^c, Luzia
5 Hermínia T. de Sousa^d, Antônia T. A. Pimenta^e, Mary Anne S. Lima^e, Bruna R. de
6 Oliveira^e, Marcos Carlos de Matos^e, Vicente de Paulo T. Pinto^{a, c}, Antônia Moêmia L.
7 R. Portela^c, Karuza Maria A. Pereira^f, José Jackson do N. Costa^g, Paula Goes^{d, h},
8 Martina Raunerⁱ, Maria Elisabete A. de Moraes^j, Mirna M. Bezerra^{a, c, j*}

9 ^a Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará,
10 62042-280, Brazil.

11 ^b School of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, 62010-820, Brazil.

12 ^c School of Medicine, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, 62042-280, Brazil.

13 ^d Postgraduate Program in Odontology, School of Odontology, Federal University of
14 Ceará, Fortaleza, Ceará, 62430-372, Brazil.

15 ^e Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará,
16 60020-181, Brazil.

17 ^f Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará,
18 Fortaleza, Ceará, 60430-170, Brazil.

19 ^g School of Medicine, University Center INTA – UNINTA, Sobral, Ceará, 62050-100,
20 Brazil.

21 ^h Department of Pathology and Legal Medicine, Medical School, Federal University of
22 Ceará, Fortaleza, Ceará, 60416-200, Brazil.

23 ⁱDivision of Endocrinology, Diabetes and Bone Diseases, Department of Medicine III &
24 Center for Healthy Aging, Technical University, Dresden, 01069, Germany.

25 ^j Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará,
26 Fortaleza, Ceará, 60430-275, Brazil. mirna@ufc.br

27

28 *Corresponding author:

29 Mirna Marques Bezerra (mirna@ufc.br)

30

31

32 Abstract

33 Periodontitis is an inflammation of the supporting tissues of the teeth with progressive
34 attachment loss and bone destruction as a result of the host response to the presence of a
35 dysbiotic microbiota. Thus, this study aimed to evaluate the anti-resorptive activity of
36 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin obtained from *Platymiscium floribundum* stems in
37 ligature-induced periodontitis in rats and the putative involvement of the HO-1 pathway
38 in the mechanism of action of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin. Further, the toxicity of
39 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin was also evaluated. Periodontitis was induced by
40 placing a sterile nylon thread ligature (3.0) around the second upper left molars. The rats
41 received (oral gavage) once a day for 11 days 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01,
42 0.1 or 1 mg/kg) or vehicle (0.9% saline + 0.1% ethanol). 6,7-dimethoxy-3-
43 nitrocoumarin (0.1 or 1 mg/kg) reduced alveolar bone loss (1.05 ± 0.24), when
44 compared to vehicle-treated group (3.05 ± 0.30). 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1
45 mg/kg) reduced the mRNA levels of Tnf- α (2.33 ± 0.56) and Il-1 β (19.87 ± 2.9), while it
46 increased both the mRNA levels of Ho-1 (43.40 ± 1.05) and catalase activity
47 (46.42 ± 4.59), when compared to vehicle-treated group (46.29 ± 8.43 ; 37.83 ± 4.38 ;
48 1.58 ± 0.11 ; 8.93 ± 1.86 , respectively). No statistical differences ($P>0.05$) were observed
49 in the serum biochemical parameters (creatinine, TALP, ALT, AST) among groups.
50 6,7- dimethoxy-3-nitrocoumarin decreased the inflammatory bone loss in ligature
51 induced-periodontitis in rats and the activation of the HO-1 pathway contributes at least
52 partially to its protective effects.

53 Keywords: periodontitis, 6,7- dimethoxy-3-nitrocoumarin; HO-1; TNF- α ; IL-1 β ,

54

55

56

57

58

59

60

61

62 **1. Introduction**

63

64 Periodontitis is one of the most prevalent inflammatory oral disorders in the
65 adult population that affects tooth-supporting tissues and alveolar bone and, with
66 progression, can cause tooth loss [1]. The complexity of its etiology is supported by
67 evidences from the literature that strongly suggest that periodontitis results from an
68 interplay between a dysbiotic biofilm and the host response, often modified by
69 behavioral factors [2].

70 In an attempt to control the infection-driven process, the activation of immune-
71 inflammatory host response results in pathophysiologic levels of inflammatory
72 mediators (cytokines, nitric oxide, proteases, reactive oxygen species, etc) from host
73 cells (epithelial cells, fibroblasts, polymorphonuclear leukocytes, osteoblasts,
74 macrophages), which may further amplify the inflammation to periodontal pathogens,
75 and promotes periodontal tissue destruction [1, 3].

76 In response to cytotoxic agents, cells have developed protective mechanisms
77 against cell stress, through the production of antioxidant enzymes and proteins that
78 prevent cell death. Among these antioxidant systems, the heme oxygenase-1 (HO-1)
79 signaling pathway plays an important role in adapting to oxidative stress, regulating the
80 transcription of antioxidant and cytoprotective genes [4]. HO-1 catalyzes the
81 degradation of heme to liberate carbon monoxide (CO), biliverdin, which is reduced to
82 bilirubin by biliverdin reductase, and free iron in mammalian cells [5].

83 Considering that the pathophysiology of periodontitis is yet to be completely
84 elucidated, added to the fact that its treatment is still a health challenge, basic and
85 clinical research are needed [6]. In this scenario, the use of plants for therapeutic
86 purposes has wide popular acceptance and support from the World Health Organization
87 (WHO) [7].

88 Natural products from plants are considered alternatives to synthetic chemicals
89 in the treatment of many diseases [8, 9]. *Platymiscium floribundum* Vog. is a tree used
90 in folk medicine in Brazil as an anti-inflammatory agent [10]. Our research group
91 showed that the extract from *P. floribundum* stem reduced inflammatory markers

92 associated with ligature-induced-periodontitis in rats without signs of toxicity [11].
93 Considering these data, we isolated a main constituent from the extract – 6,7-
94 dimethoxycoumarin- that showed antireabsorptive effect in this model. Based on the
95 original coumarin molecule we obtained a semisynthetic derivative, named 6,7-
96 dimethoxy-3-nitrocoumarin (patent number BR1020130287938). Therefore, this study
97 aimed to evaluate to evaluate the anti-resorptive activity of 6,7-dimethoxy-3-
98 nitrocoumarin obtained from *Platymiscium floribundum* stems in ligature-induced
99 periodontitis in rats and the putative involvement of the HO-1 pathway in the
100 mechanism of action of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin. Furthermore, a systemic
101 evaluation of the toxicity of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin was also performed.

102

103 **2. Materials and methods**

104 *2.1. Plant material*

105

106 *Platymiscium floribundum* Vog. was collected in Acarape County, Ceará State,
107 Brazil. A voucher specimen (Voucher No.: 31052) was identified by Dr. Edson Paula
108 Nunes and deposited at the Prisco Bezerra Herbarium of Biology Department of Federal
109 University of Ceará, Brazil (Fortaleza, Ceará, Brazil). For this study, the stem of
110 *Platymiscium floribundum* was the fraction of the plant used to obtain the product
111 isolated and derived.

112

113 *2.2. Isolation de 6,7-dimetoxicoumarin*

114

115 The extract chloroformic (350.0 g) was fractioned on a silica gel column by
116 elution with hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and MeOH, successively, to yield four fractions.
117 Successive flash chromatographies of the CH₂Cl₂ fraction (20.0 g) on silica gel using
118 hexane/EtOAc mixture with increasing polarity yielded the 6,7-dimethoxycoumarin (1)
119 as a white solid (96.5 mg).

120

121 2.3. *Semisynthesis de 6,7-dimetox-3-nitrocoumarin*

122

123 The nitration reaction of 6,7-dimethoxycoumarin (1) was performed by addition
124 of glacial acetic acid (1.25 mL) and nitric acid 65% (0.5 mL) in a round-bottom flask
125 (10.0 mL) by stirring at 20 °C temperature. The 6,7- dimethoxycoumarin (1) (50.0 mg;
126 0.25 mmol) was added to the flask, and the reactional mixture remained stirring at room
127 temperature for 30 minutes. The progress of the reaction was monitored by thin layer
128 chromatography, until the disappearance of the spot related to starting material. After
129 that, distilled water (2.0 mL) was added to the flask and the product was extracted by
130 liquid-liquid partition with ethyl acetate (3 × 50.0 mL), and latter washed with a
131 saturated chloride solution (1 x 10.0 mL). The organic phases were combined and dried
132 with anhydrous Na₂SO₄. After filtration, the solvent evaporated under reduced pressure
133 to obtain 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (2) as a yellow amorphous solid with 90%
134 yield (56.0 mg) (Figure 1).

135

136 2.4. *Animals*

137

138 A total of 127 female Wistar rats (180-240 g), provided by the Animal Care Unit
139 of the Federal University of Ceará (UFC - Fortaleza, Brazil), were randomly housed in
140 appropriate plastic cages at 23 ± 2 °C, with a 12-hour light-dark cycle (light from 06:00
141 AM to 6:00 PM), with access to water and food ad libitum. The sample size was
142 determined assuming $\alpha = 0.05$ and power of 0.8. Thus, a sample size of 6 animals per
143 group was required. The study was conducted in accordance with both the ARRIVE
144 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines and the guidelines of
145 the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). The Institutional
146 Committee of Animal Care and Use of the School of Medicine, Federal University of
147 Ceará, Sobral, Ceará, Brazil, approved all the experiments under registration number
148 02/2019.

149

150 2.5. *Experimental protocol*

151

152 Animals were divided into the following groups: naive (rats not submitted to
153 periodontitis induction); not-treated – NT (rats submitted to periodontitis induction and
154 treated by oral gavage with vehicle (0.9% saline + 0.1% ethanol) for 11 days; and 6,7-
155 dimethoxy-3-nitrocoumarin (rats submitted to periodontitis induction and treated by oral
156 gavage with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin at doses of 0.01, 0.1 or 1 mg/kg for 11
157 days.

158 The rats were submitted to periodontitis under anesthesia (i.p) (ketamine 90
159 mg/kg + xylazine 10 mg/kg) by placing a nylon thread (3.0 Nylpoint, Ceará, Brazil)
160 around the second upper left molar, as described by Bezerra et al. (2000) [12].

161

162 *2.6. Determination of bone loss*

163

164 On the 11th day, rats were euthanized with an overdose of ketamine/xylazine
165 (300:30mg/kg; i.p.). The maxillae were harvested and fixed in buffered formalin (10%),
166 as described by Teixeira et al. (2017) [13]. The maxillae were dissected and stained with
167 methylene blue (1%), fixed in a piece of wax, and photographed. The morphometric
168 analysis of bone resorption was performed using the ImageJ® Software (National
169 Institute of Health, Bethesda, MD, USA), as described previously [11, 13, 14]. Alveolar
170 bone loss, which is calculated as the exposed surface area of the molar root (square
171 millimeters) on the buccal surface on the left side of the maxilla, was obtained by
172 subtracting the total left maxilla area, including the tooth and bone resorption area, by
173 the area of the right maxilla. All images obtained were compared with a previously
174 established area (1.0 x 1.0 mm²) [15, 16].

175

176 *2.7. Histopathological analysis of alveolar bone*

177

178 Another set of experiments was performed for the alveolar bone
179 histopathological analysis. After 11 days of treatment, the rats were sacrificed, and the

180 maxillae were excised as described above, fixed in 10% neutral buffered formalin and
181 demineralized in 7% formic acid (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP,
182 Brazil) for 3 days, and prepared for H&E staining. The H&E-stained maxillae were
183 semiquantitatively evaluated, corresponding to the area between the first and second
184 molars, for the following parameters: cell influx, osteoclast numbers, and alveolar
185 process and cementum integrity, giving a (0–3) score grade for each of these
186 parameters, as previously described [11, 13, 14].

187

188 *2.8. Tnf- α , Il-1 β , Ho-1 mRNA expression by RT-qPCR analysis*

189

190 Total RNA was extracted from gingival samples using the TRIzol reagent
191 (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The reverse transcription was performed using
192 SuperScript IV Reverse transcriptase Invitrogen (São Paulo, Brazil) following the
193 manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-
194 PCR) was performed in StepOne Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems,
195 Warrington, UK) using SYBRR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington,
196 UK), as indicated by the manufacturer.

197 The relative gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [17]. The
198 primers used in this study are shown in Table 1. The glyceraldehyde 3-phosphate
199 dehydrogenase (Gapdh) was used as endogenous control for normalization of
200 messenger RNA expression. The specificity of each primer pair was confirmed by
201 melting curve analysis of PCR products.

202

203 *2.9. Catalase activity assessment*

204

205 The gingivae surrounding maxillary left molars were removed on 11th day and
206 stored at -80 °C. These tissues were used to evaluate the effect of 6,7-dimethoxy-3-
207 nitrocoumarin (1mg/kg) on the oxidative stress.

208 CAT activity has as principle the measurement of O₂ production rate and H₂O in
209 proportion of H₂O₂. Briefly, 20 µl of gingival homogenate was mixed with a solution
210 comprised of 3% H₂O₂ and Tris-HCl EDTA buffer (5 nM, pH 8.0). The absorbance at a
211 230 nm wavelength was measure immediately and 6 minutes after preparing 186 the
212 samples [18].

213

214 *2.10. Toxicity assessment*

215

216 After 11 days of treatment, the rats were anesthetized and blood samples were
217 collected from the abdominal aorta and centrifuged for dosing of total alkaline
218 phosphatase (TALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase
219 (AST), and creatinin. Dosages were done following the manufacturer's instructions
220 (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brazil).

221 Additionally, after euthanasia, stomach, liver and kidneys were removed for
222 organ weight assessment and prepared for hematoxylin and eosin (H&E) staining. The
223 H&E-stained organs were semiquantitatively evaluated for loss of epithelial cells,
224 vascular congestion, hemorrhagic damage, edema, inflammatory cells, and necrosis,
225 giving a (0–3) score grade for each of these parameters. These observations were made
226 by an experienced pathologist who was blinded to the treatment protocol.

227

228 *2.11. Statistical analysis*

229

230 All data were normalized using the Shapiro-Wilk normality test. Results are
231 shown as mean±standard error (SEM) or as median, when appropriate. ANOVA
232 followed by Tukey test or Games-Howell test was used to compare means and Kruskal-
233 Wallis and Dunn tests were used to compare the medians. P <0.05 was considered
234 significant. The analyzes were performed using IBM SPSS Statistics for Windows,
235 Version 20.0. Software Armonk, NY or GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA.

236

237 3. Results

238 3.1. Obtaining the semi-synthetic nitro derivative

239

240 The natural product 6,7-dimethoxycoumarin (**1**) was isolated from the
241 chloroformic extract from stem of *P. floribundum*. Its ¹H NMR spectrum displayed
242 signals relative to a cis double bond at δ 6.26 (d, 1H, H-3) and δ 7.81 (d, 1H, H-4) with a
243 large coupling constant of 9.5 Hz, in addition to signals relative to aromatic hydrogens
244 at δ 6.83 (s, 1H, H-5) and δ 6.85 (s, 1H, H-8), and two methoxy groups at δ 3.91 (s,
245 3H, OCH₃-7) and δ 3.94 (s, 3H, OCH₃-8). The HSQC spectrum allowed the
246 correlation of all hydrogens with its respective carbons.

247 The semisynthetic 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (**2**) derivative was obtained
248 through the nitration reaction of (**1**). Comparison of RMN spectral data of compound
249 6,7-dimethoxy-coumarin (**1**) with those related to compound 6,7-dimethoxy-3-
250 nitrocoumarin (**2**), showed some differences. The observation of the absence of the
251 hydrogen relative to H-3 in the ¹H RMN spectrum of **1**, besides the substitution of the
252 methine unsaturated carbon by additional signal relative a unsaturated quaternary
253 carbon at δ C in the ¹³C NMR spectrum of **2**, confirmed the presence of the NO₂ group.
254 The relative position of the nitro group on C-3 carbon was definitely inferred by
255 comparison of its NMR data with those reported to the synthetic 6,7-dimethoxy-3-
256 nitrocoumarin (**2**), obtained during the synthesis of lamellarin H by Manjappa et al.
257 (2017) [19]. Figure 1 shows the nitration reaction of 6,7-dimethoxy-coumarin (**1**) to
258 obtain the 6,7-dimethoxy-3-nitro-coumarin (**2**).

259 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (**2**): yellow amorphous solid. ¹H NMR (C₅D₅,
260 300 MHz): δ 3.86 (s, 3H, H-9), δ 3.89 (s, 3H, H-10), δ 7.04 (s, 1H, H-5), δ 7.27 (s,
261 1H, H-8), δ 9.07 (s, 1H, H-4). ¹³C NMR (C₅D₅, 75 MHz): δ 56.6 (OCH₃, C-10), δ 57.1
262 (OCH₃, C-9), δ 100.5 (CH, C-8), δ 109.9 (CH, C-5), δ 110.5 (C, C-4a), δ 136.2 (C, C-
263 3), δ 144.0 (CH, C-4), δ 148.3 (C, C-8a), δ 153.5 (C, C-7), δ 158.0 (C, C-2).

264

265 3.2. Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin on alveolar bone loss

266

267 The challenge of periodontitis was associated with alveolar bone loss (Figure
268 2A), root exposure and loss of interdental contact (Figure 2B-b) when compared to the
269 naive group (Figure 2B-a).

270 The semi-synthetic derivative 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.1 or 1 mg/kg)
271 prevented ($P < 0.01$; $P < 0.0001$, respectively) the alveolar bone loss (Figure 2A), the root
272 exposure, and the loss of interdental contact (Figure 2B-d and Figure 2B-e,
273 respectively) when compared to the not-treated group (NT) (Figure 2B-b). Similarly,
274 histopathological analysis (H&E) showed that the semi-synthetic derivative 6,7-
275 dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) was able to reduce the inflammatory cell
276 infiltrate, with preservation of the alveolar bone, cementum and periodontal ligament,
277 with a median score of 1 (0-2). These values were statistically different ($P < 0.04$) when
278 compared with the not-treated group (NT).

279

280 *3.3. Effects of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1mg/kg) on mRNA levels of Tnf- α , Il1- β ,*
281 *and Ho-1*

282

283 The periodontitis-challenged group expressed a significant increase in the
284 mRNA levels of Tnf- α (46.29 ± 8.43) and Il-1 β (37.83 ± 4.38 ;) when compared to naive
285 group (0.99 ± 0.01 and 1.01 ± 0.01 , respectively) ($P < 0.0003$; $P < 0.0001$, respectively)
286 (Figure 3A and 3B). The administration of the 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin
287 significantly reduced the mRNA levels of Tnf- α (2.33 ± 0.56) and Il-1 β (19.87 ± 2.9)
288 when compared to not-treated group (46.29 ± 8.43 and 37.83 ± 4.38 , respectively)
289 ($P < 0.0003$; $P < 0.0060$, respectively). (Figure 3A and figure 3B). Furthermore, the
290 treatment with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin significantly increased the mRNA levels
291 of Ho-1 (43.40 ± 1.05) when compared to both naive (1.01 ± 0.01) and not-treated
292 (1.58 ± 0.11) groups ($P < 0.0001$; $P < 0.0001$, respectively) (Figure 3C).

293

294 *3.4. Effects of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1mg/kg) on catalase activity*

295

296 The group subjected to periodontitis showed a significant reduction ($P < 0.0002$)
297 on the activity of the oxidative stress marker catalase in the gingival tissue (8.93 ± 1.86)
298 when compared to the naive group (112.56 ± 10.51) (Figure 3D). On the other hand, 6,7-
299 dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) significantly ($P < 0.0084$) increased the catalase
300 activity (46.42 ± 4.59) when compared to not-treated group (NT) (8.93 ± 1.86) (figure
301 3D).

302

303 3.5. Toxicity assessment

304

305 Repeated administration of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) over 11
306 consecutive days did not produce any signs of toxicity or mortality. The serum levels of
307 creatinine and enzymatic markers of hepatic function (TALP, ALT, AST) were
308 unchanged, when compared to the not-treated animals (Table 2).

309 The wet weights of the stomach, liver, and kidneys were normal. Additionally,
310 to corroborate with these data, we histologically evaluated these organs. Table 3 shows
311 no toxicity indication at histopathological analysis for 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin
312 (1 mg/kg) for the kidneys. The stomach and the liver showed that both organs were
313 reversibly affected by 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) treatment, leading to
314 discrete not specific reactive changes (Table 3), which suggests that the 6,7- dimethoxy-
315 3-nitrocoumarin (1 mg/kg) do not cause systemic toxicity in vivo.

316

317 4. Discussion

318

319 In the last years our research group have been dedicated to identify which
320 naturally-occurring agents have effects in preventing bone loss in the ligature-induced
321 periodontitis model in rats. Our research group showed that *Platymiscium floribundum*
322 Vog. extract has anti-inflammatory, antioxidant, and anti-resorptive properties in the
323 ligature-induced periodontitis in rats without any signs of toxicity [11]. Herein we
324 described the semisynthesis of the 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin based on the
325 naturally occurring coumarin 6,7-dimethoxycoumarin which is present in the *P.*

326 *floribundum* stem, and its protective effect in the ligature-induced periodontitis in rats.
327 The semi-synthetic derivative 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.1 or 1 mg/kg) reduced
328 the alveolar bone loss and its administration did not produce signs of toxicity. When we
329 examined the mechanisms by which 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin could reduce the
330 alveolar bone loss, we found out that this semi-synthetic derivative reduced the mRNA
331 levels of TNF- α and IL1- β , while it increased the HO-1 mRNA levels and the catalase
332 (CAT) activity. Within the limits of this study, our findings suggest that the activation
333 of the HO-1 pathway contributes, at least partially, to the 6,7-dimethoxy-3-
334 nitrocoumarin antireabsorptive effects.

335 In recent years, plant-derived molecules have been identified as an important
336 source of medicines [20]. However, purely natural products may have suboptimal
337 pharmacological properties, including high toxicity, deficient pharmacokinetics, rapid
338 metabolism, low solubility or poor chemical stability [21]. In this context, the
339 pharmaceutical industry has used chemical and biotechnological resources to produce
340 semi-synthetic medicines derived from natural products, increasing the profitability of
341 the final product, improving its physical-chemical characteristics and ensuring the
342 safety of the medicine.

343 Our group recently patented a semi-synthetic molecule based on 6,7-
344 dimethoxycoumarin from *P. floribundum*. We used the coumarin nitration in carbon C3
345 confirming the presence of NO₂ through magnetic resonance to synchronize a new
346 molecule with important biological activities. The approach is highly attractive since the
347 components fused with coumarin can be built in a highly economical and fast way [19]
348 which can facilitate the process of drug development and possible commercialization at
349 a relatively low cost.

350 The pharmacological potential of *P. floribundum* is already known. It is
351 documented that its extracts have activity against human leukemia HL-60 cells [22], and
352 antifungal and acetylcholinesterase activity [23]. Coumarins are important secondary
353 metabolites of *P. floribundum* and specifically 6,7-dimethoxycoumarin, or scaporone,
354 showed leishmanicidal effect [24]. In this context, the proven biological activities of the
355 *P. floribundum*, the presence of coumarins in their isolated fractions, and the need to
356 seek safer therapeutic agents for the treatment of periodontitis, supported the
357 investigation of the effects of 6,7- dimethoxy-3-nitrocoumarin.

358 It has been shown that a large number of the drugs used in the treatment of
359 periodontitis are of synthetic, semisynthetic or completely natural origin [25]. In the
360 present study, the treatment with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.1 or 1 mg/kg)
361 ameliorated ligature-induced bone loss and the damage to the periodontal ligament and
362 cementum. This data confirms our previous report [11] where we demonstrated that *P.*
363 *floribundum* extract (10 mg/kg) reduced alveolar bone loss and increased the serum
364 levels of BALP, an isoenzyme of alkaline phosphatase considered a marker of bone
365 formation.

366 Ligature-induced experimental periodontitis is a reliable animal model and
367 widely used technique for seek the effects of medicinal plants for the treatment of
368 periodontitis [26]. In this regard, inhibiting the production of pro-inflammatory
369 mediators is considered an important step. On this subject, TNF- α and IL-1 β are potent
370 pro-inflammatory mediators and bone-resorbing cytokines. As a matter of fact, during
371 periodontitis these cytokines are related to induce the chemotaxis of neutrophils and
372 macrophages, the production of prostaglandin E2 and metalloproteinases, and the
373 activation of lymphocytes and osteoclasts, amplifying the inflammatory response [6].
374 Our present data shows that that the antireabsorptive effect of the 6,7-dimethoxy-3-
375 nitrocoumarin (1 mg/kg) was associated with reducing in the mRNA levels of TNF- α
376 and IL1- β , when compared to not-treated group. This result is in line with our previous
377 report using the extract of the natural compound *P. floribundum* (10 mg/ kg) that
378 reduced the mRNA levels of both TNF- α and IL-1 β [11]. Actually, TNF- α and IL-1 β
379 are the most common cytokine isolated from patients with periodontitis and significant
380 decrease in the levels of these cytokines are associated with improvements in clinical
381 parameters (including plaque index, gingival bleeding, probing depth and clinical
382 attachment levels) [27].

383 The inflammation and the concurrent challenge of oxidative stress, which
384 together are involved in the pathogenesis of the periodontitis, culminate in the alveolar
385 bone damage and ultimately tooth loss. Although the underlying mechanism of
386 periodontitis still remains unveiled, numerous basic experimental and clinical studies
387 have suggested the involvement of the oxidative stress the pathophysiology of the
388 periodontitis [28]. Considering pre-clinical studies, our research group have confirmed
389 that the inflammatory response in ligature-induced periodontitis in rats is associated
390 with an increased local oxidative stress and compromised antioxidant capacity [11, 13].

391 Also, there was a relationship between the local biomarkers of oxidative stress and the
392 bone loss observed during the course of this animal model.

393 In the present work we showed that catalase activity was decreased by 68% in
394 the gingival tissues from the rats subjected to the ligature-induced periodontitis, when
395 compared with the naive group, which may reflect the consumption of antioxidant
396 enzymes due periodontitis challenge. Catalase was the first antioxidant enzyme to be
397 characterized and it has one of the highest turnover rates for all enzymes: one molecule
398 of catalase can convert approximately 6 million molecules of H_2O_2 to $2H_2O + O_2$ each
399 minute [29]. In contrast, the treatment with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg)
400 significantly increased tissue catalase activity, when compared with not-treated group.
401 The restored levels of catalase activity may be related to the antireabsorptive effects of
402 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin against alveolar bone loss. Our present data is in
403 accordance with our previous report [11] when the treatment with *P. floribundum*
404 extract (10 mg/kg) of rats subjected to ligature-induced periodontitis was associated
405 with increasing in the gingival tissue catalase activity. Our data are supported by some
406 authors who have found significant decrease in the activities of catalase during
407 periodontitis [28].

408 Antioxidant enzymes protect the tissue integrity by preventing the damaging
409 activity of reactive oxygen species (ROS). In this context, heme oxygenase-1 (HO-1) is
410 a key enzyme triggered by oxidative stress, cytokines, and other mediators produced
411 during cellular stress, exhibiting cytoprotective, antioxidant, and anti-inflammatory
412 abilities [4]. To date, three isoforms of HO (HO-1, HO-2 and HO-3) have been
413 identified in mammalian. Among the different HO isoforms, HO-1 is considered of
414 most interest, because its expression level may be upregulated by heme, endotoxins,
415 cytokines, nitric oxide, reactive oxygen species, and hypoxia in a plethora of cells
416 (endothelial cells, monocytes/macrophages, neutrophils and fibroblasts) during
417 pathophysiological conditions [30]. HO-1 catalyzes heme degradation to iron
418 (sequestered by ferritin), biliverdin/bilirubin, and carbon monoxide (CO). Ferritin and
419 biliverdin/bilirubin are considered potent antioxidant molecules due to its ROS
420 scavenging activity, while CO suppresses the synthesis of inflammatory mediators [31].

421 The mechanism of heme degradation employed by HO-1 has proven to be an
422 effective method of suppressing oxidative dysregulation, inappropriate immune

423 response, and related disorders. Particularly, some authors have evaluated the regulatory
424 function of HO-1 on bone metabolism [32]. In normal bone, the level of HO-1 in
425 osteoblasts and osteoclasts is very low [33]. However, in the presence of cell stress, the
426 expression of HO-1 can reduce cellular damage. In fact, some authors demonstrated that
427 when osteoblasts were exposed to ethanol-damage there was an increase in the levels of
428 ROS, TNF- α , and IL-1. On the other hand, the HO-1 transfection into the osteoblasts
429 decreased the oxidative stress and cytokines levels induced by ethanol, suggesting that
430 HO-1 plays a protective role in osteoblasts [34]. Therefore, in the present study, we
431 investigated the involvement of HO-1 in the efficacy of the 6,7-dimethoxy-3-
432 nitrocoumarin. Then, the cytoprotective gene HO-1 was evaluated by qPCR. Here, we
433 found very low levels of HO-1 mRNA in the naive group (animals without
434 periodontitis). Similarly, the group submitted to periodontitis and treated only with
435 vehicle (saline solution + 0.1% ethanol) showed low levels of HO-1 mRNA. These
436 findings are in agreement with our previous report where we showed the HO-1
437 involvement in periodontitis using the ligature-induced periodontitis in rats [35].
438 Furthermore, the treatment with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin increased the levels of
439 HO-1 mRNA. The upregulation of HO-1 may inhibit the production of ROS by
440 decreasing the cellular heme, and increasing the reduced glutathione and catalase levels
441 [36]. Additionally, some authors showed that HO-1 exerts its antioxidant and anti-
442 inflammatory effects through the inhibition of cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β
443 [37]. Taken together, our results suggest that 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin inhibits
444 alveolar bone loss possibly by reducing the mRNA levels of TNF- α and IL-1 β , while it
445 increased the HO-1 ones and catalase activity. Accordingly, our data suggest that 6,7-
446 dimethoxy-3-nitrocoumarin exerts its antireabsorptive effects by anti-inflammatory and
447 anti-oxidant actions.

448 Apart from scaling and root planning, there is an increasing interest in
449 developing safe therapeutics options to care patients suffering from periodontitis. In the
450 present study we used a recently patented semi-synthetic molecule based on naturally
451 occurring coumarin 6,7-dimethoxycoumarin which is present in the *P. floribundum*
452 stem. Here, we demonstrated that repeated administration of 6,7- dimethoxy-3-
453 nitrocoumarin (1 mg/kg) over 11 consecutive days did not produce signs of toxicity or
454 mortality. Some scientific reports suggested that *P. floribundum* and its constituents are
455 devoid of toxicity. In this regard, an in vitro assay was conducted to assess the potential

456 toxicity of a coumarin isolated from *P. floribundum* stems on murine RAW 264.7
457 macrophage, and the tested coumarin was not cytotoxic to macrophages [24]. Besides,
458 in a previous study, when our research group treated the animals for 11 days with with
459 *P. floribundum* extract (10 mg/kg), neither biochemical analysis nor the
460 histopathological ones revealed any signs of toxicity [11].

461 **5. Conclusion**

462

463 In summary, the present study suggests that 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin
464 upregulates the expression of the HO-1 gene in the gingival tissue and that HO-1 may
465 protect rats from alveolar bone loss by both reducing TNF- α and IL-1 β mRNA levels
466 and increasing catalase activity.

467

468 **Conflict of interest**

469 The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

470

471 **Acknowledgments**

472 The authors thank Anderson Weiny Barbalho Silva, Alana Nogueira Godinho,
473 Nayara Alves, Flávia de Araújo Silva and Adalberto Nascimento de Lima Júnior for
474 excellent technical support. We also gratefully thank the NEMPI of Federal niversity of
475 Ceara, Ceara, Brazil, for SEM analysis. This work was supported by Brazilian grants
476 from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de
477 Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento
478 Científico e Tecnológico (Funcap), and Instituto de Biomedicina do Semi-Árido
479 Brasileiro (INCT-IBISAB). Mirna Marques Bezerra (CNPq grant #312209/2017-7),
480 Hellíada Vasconcelos Chaves (CNPq grant #312209/2017-7) and Karuza Alves Pereira
481 (CNPq grant #310375/2018) are Senior Investigators of CNPq/Brazil. Vicente de Paulo
482 Teixeira Pinto is investigator of Funcap/Ceara/Brazil (FUNCAP grant # BP3-0139-
483 00228.01.00/18).

484

485 **References**

- 486 [1] Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., Papapanou, P.N. Periodontal diseases. *Nat Rev*
487 *Dis Primers*. 3. (2017) 1-14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>.
- 488 [2] Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D.H.,
489 Flemmig, T., Garcia, R., Giannobile, W.V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D.,
490 Kao, R.T., Kerschull, M., Kinane, D.F., Kirkwood, K.L., Kocher, T., Kornman, K.S.,
491 Kumar, P.S., Loos, B.G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I.,
492 Offenbacher, S., Seymour, G.J., Teles, R., Tonetti, M.S. Periodontitis: Consensus
493 report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal
494 and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. of clin. Periodontology*. 45. (2018) 162-
495 170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>.
- 496 [3] Sorsa, T., Gursoy, U. K., Nwhator, S.; Hernandez, M., Tervahartiala, T.,
497 Leppilahti, J., Gursoy, M., Kononen, E., Emingil, G., Pussinen, P. L., Mäntylä, P.
498 Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP- 8, in gingival crevicular fluid,
499 mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 70.
500 (2016) 142-163. <https://doi.org/10.1111/prd.12101>
- 501 [4] Waza, A.A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S.A., Bhat, M.A. A review on heme
502 oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflammation Research*. 67. (2018). 579-
503 588. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1151-x>.
- 504 [5] Ryte, W. S. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and
505 inflammation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 678. (2019) 1-11.
506 <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108186>.
- 507 [6] Pan, W., Wang, Q., Chen, Q. The Cytokines network involved in the host immune
508 response to periodontitis. *International Journal of Oral Sciences*. 11. (2019) 1-13.
509 <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z>.
- 510 [7] Werkman, C. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L (romã). *Revista*
511 *Brasileira de Plantas Mediciniais*, São Paulo. 10. (2008). 104-111.
- 512 [8] Patil, K. R., Mahajan, U.B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S.J.,
513 Ojha, S., Patil, C.R. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-
514 inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of

- 515 Phytopharmaceuticals. Int. J. Mol. Sci. 20. (2019) 4367.
516 <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>
- 517 [9] Lautié, E., Russo, O., Ducrot, P., Boutin, J.A. Unraveling Plant Natural Chemical
518 Diversity for Drug Discovery Purposes. *Frontiers in pharmacology*. 11. (2020) 1-102.
519 <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00397>
- 520 [10] Falcão, M. J. C.; Pouliquem, Y. B. M.; Lima, M. A. S.; Gramosa, N. V.;
521 Costalotoufo, L. V.; Militão, G. C. G.; Pessoa, C.; moraes, M. O.; Silveira, E. R.
522 Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. *Journal of natural products*. 68.
523 (2005). 423-426. <https://doi.org/10.1021/np049854d>.
- 524 [11] Freire, J.M.O., Chaves, H.V., Teixeira, A.H., de Sousa, L.H.T., Pinto, I.R., Costa,
525 J.J. dN, et al., Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on
526 periodontitis inflammation in rats. *PLoS ONE*.14 (2019). e0223800.
527 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223800>.
- 528 [12] Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B. M., Vieira, I. B., Brito, G. A.,
529 Ribeiro, R. and, & Rocha, F. A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar
530 bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. 71. (2000).
531 1009–1014. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.1009>.
- 532 [13] Teixeira, A.H., Freire, J. M., de Sousa, L.H.T., Parente, A.T., de Sousa N.A.,
533 Arriaga, A.M.C., Lopes da Silva, F.R., Melo, I.M., Castro da Silva, I.I., Pereira,
534 K.M.A., Goes, P., Costa, J.J.dN., Cristino-Filho, G., Pinto, V. P.T., Chaves, H.V.,
535 Bezerra, M.M. *Stemodia maritima* L. extract decreases Inflammation, oxidative stress,
536 and alveolar Bone loss in na experimental Periodontitis Rat Model. *Front. Physiol*. 8.
537 (2017). 988. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00988>.
- 538 [14] Ribeiro, D. D. S. F., De Oliveira Freire, J. M., Teixeira, A. H., Do Val, D. R.,de
539 Freitas, A. R., Gomes, F. I. F., Silva, A. A. R., Bandeira, P. N., Santos, H.S., Do Santos,
540 W. P., Ávila, F. N., Pereira, K. M. A., Góes, P., Pinto, V. P. T., Cristino-Filho,
541 G.,Albuquerque, M R. J. R., Chaves, H. V. *Tocoyena sellowiana* extract decreases bone
542 loss in an experimental model of periodontitis in rats: Putative role for cyclooxygenase-
543 2 and IL-1 β inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 98.(2018). 863-872.
544 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.011>

- 545 [15] Goes, P., Lima, A.P.S., Melo, I.M., Rêgo, R.O.C.C. Effect of Atorvastatin in
546 radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. *Braz Dental J.* 21. (2010).
547 193–198. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402010000300003>.
- 548 [16] Alexandre, J.T.M., de Sousa, L.H.T., Lisboa, M.L.P., Furlaneto, F.A.C., do Val,
549 D.R., Bezerra, M. M., Chaves, H.V., Melo. I.M., Leitão, R., Brito, G. C. B., Goes, P.
550 Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinallis* on inflammatory
551 bone loss in rats. *Clinical Oral Investigations.* 22. (2018). 2175-2185.
552 <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2308-7>.
- 553 [17] Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using
554 Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 25. (2001). 402–408.
555 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- 556 [18] Maehly, A. C., and Chance, B., 1954. The Assay of Catalases and Peroxidase.
557 *Methods of Biochemical Analysis.* 1, 357–424.18.
- 558 [19] Manjappa, K. B., Lin, J., Yang, D. Construction of pentacyclic lamellarin skeleton
559 via Grob Reaction: Application to Total Synthesis of Lamellarins H and D. *J. Org.*
560 *Chem.* 82. (2017). 7648–7656. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01061>.
- 561 [20] Uddin, G., Rauf, A., Siddiqui, B.S., Muhammad, N., Khan, A., Shah, S.U.A.,
562 Rauf, D.A. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts
563 and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. *Phytomedicine.* 21. (2014). 954–959.
564 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.03.001>.
- 565 [21] Yñiguez-Gutierrez, A.E., Bachmann, B.O. Fixing the Unfixable: The Art of
566 Optimizing Natural Products for Human Medicine. Department of Chemistry. *J. Med.*
567 *Chem.* 62. (2019). 8412–8428. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00246>.
- 568 [22] Militão, G.C.G., Dantas, I.N.F., Pessoa, C., Falcão, M.J.C., Silveira, E.R.; Curi,
569 R. et al. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-
570 60 human leukemia cells. *Life Sci.* 78 (2006). 2409–2417.
571 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.044>.
- 572 [23] Cardoso-lobes, E.M., Carreira, R.C., Agripino, D.G., Torres, L.M.B., Cordeiro, I.,
573 Bolzani, V.S. et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic
574 activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest: Ilha do Cardoso State Park.

- 575 Rev. Bras. Farmacogn. 18. (2008). 655–660. <https://doi.org/10.1590/S0102->
576 695X2008000500002.
- 577 [24] Vila-Nova, N. S., Morais, S.M., Falcão, M.J.C., Bevilaqua, C.M.L., Rondon,
578 F.C.M., Wilson, M. E., Vieira, I.G.P., Andrade, H.F. Leishmanicidal and cholinesterase
579 inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and
580 *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome1. *Pesq. Vet. Bras.* 32.
581 (2008). 1164-1168. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100015>.
- 582 [25] Freires, I.A., Santaella, G.M., de Cássia Orlandi Sardi J., Rosalen, P.L. The
583 alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. *Arch Oral*
584 *Biol.* 87. (2018). 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.019>.
- 585 [26] Jeong-Hyon, K., Bon-Hyuk, G., Sang-Soo, N., Yeon-Cheol, P. A review of rat
586 models of periodontitis treated with natural extracts. *Journal of Traditional Chinese*
587 *Medical Sciences.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2020.05.005>.
- 588 [27] Javed, F., Al-Hezaimi, K., Salameh, Z., Almas, K., Romanos, G.E.
589 Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis.
590 *Cytokine.* 53. (2011). 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.08.013>.
- 591 [28] Tóthová, L., Celec, P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and
592 Therapy of Periodontitis. *Front Physiol.* 8. (2017). 1055.
593 <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01055>.
- 594 [29] Kurutas, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular
595 response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J.* 15. (2016). 71.
596 <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.
- 597 [30] Vijayan, V., Wagener, F.A.D.T.G. Immenschuh S. The macrophage heme
598 oxygenase-1 system and its role in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 153. (2018).
599 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.010>.
- 600 [31] Wu, B., Wu, Y., Tang, W. Heme Catabolic Pathway in Inflammation and Immune
601 Disorders. *Front Pharmacol.* 10. (2019). 825. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00825>.
- 602 [32] Anselmino, N., Starbuck, M., Labanca, E., et al. Heme Oxygenase-1 Is a Pivotal
603 Modulator of Bone Turnover and Remodeling: Molecular Implications for Prostate

- 604 Cancer Bone Metastasis. *Antioxid Redox Signal.* 32. (2020). 1243-1258.
605 <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7879>.
- 606 [33] Barbagallo, I., Vanella, A., Peterson, S.J. et al. Overexpression of heme
607 oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab.*
608 28. 2010. 276-288. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0134-y>.
- 609 [34] Li, J., Zhang, F.Q., Du, Z.N., Cai, T., Cai, P.S., Fan, L. Protective effect of HO-1
610 transfection against ethanol-induced osteoblast damage. *J Huazhong Univ Sci*
611 *Technol Med Sci.* 35. (2015). 374-377. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-14403>.
- 612 [35] Souza, R.B., Gomes, F.I.F., Pereira, K.M.A., Dutra, P.G.P., da Cunha, R.M.,
613 Chaves, H.V., Bezerra, M.M. Strontium Ranelate Elevates Expression of Heme
614 Oxygenase-1 and Decreases Alveolar Bone Loss in Rats. *J Oral Maxillofac Res.* 9.
615 (2018). <https://doi.org/10.5037/jomr.2018.9404>.
- 616 [36] Turkseven. S., Kruger, A., Mingone, C.J. et al. Antioxidant mechanism of heme
617 oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental
618 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289. (2005). 701-707.
619 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00024.2005>.
- 620 [37] Ndisang, J.F., Jadhav, A., Mishra, M. The heme oxygenase sys- tem suppresses
621 perirenal visceral adiposity, abates renal inflam- mation and ameliorates diabetic
622 nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *PLoS One.* 9. (2014). e87936.
623 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.008793>.

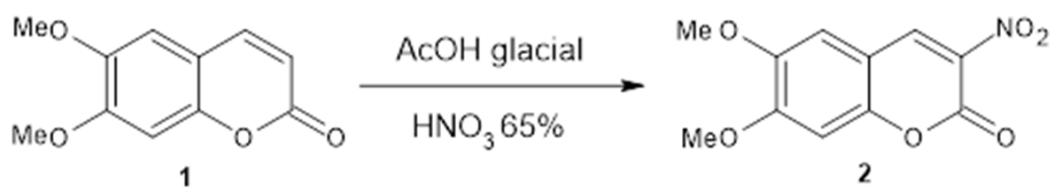
Figure 1:

Fig. 1. Nitration reaction of 6,7-dimethoxycoumarin (1) to obtain the 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (2).

Figure 2:

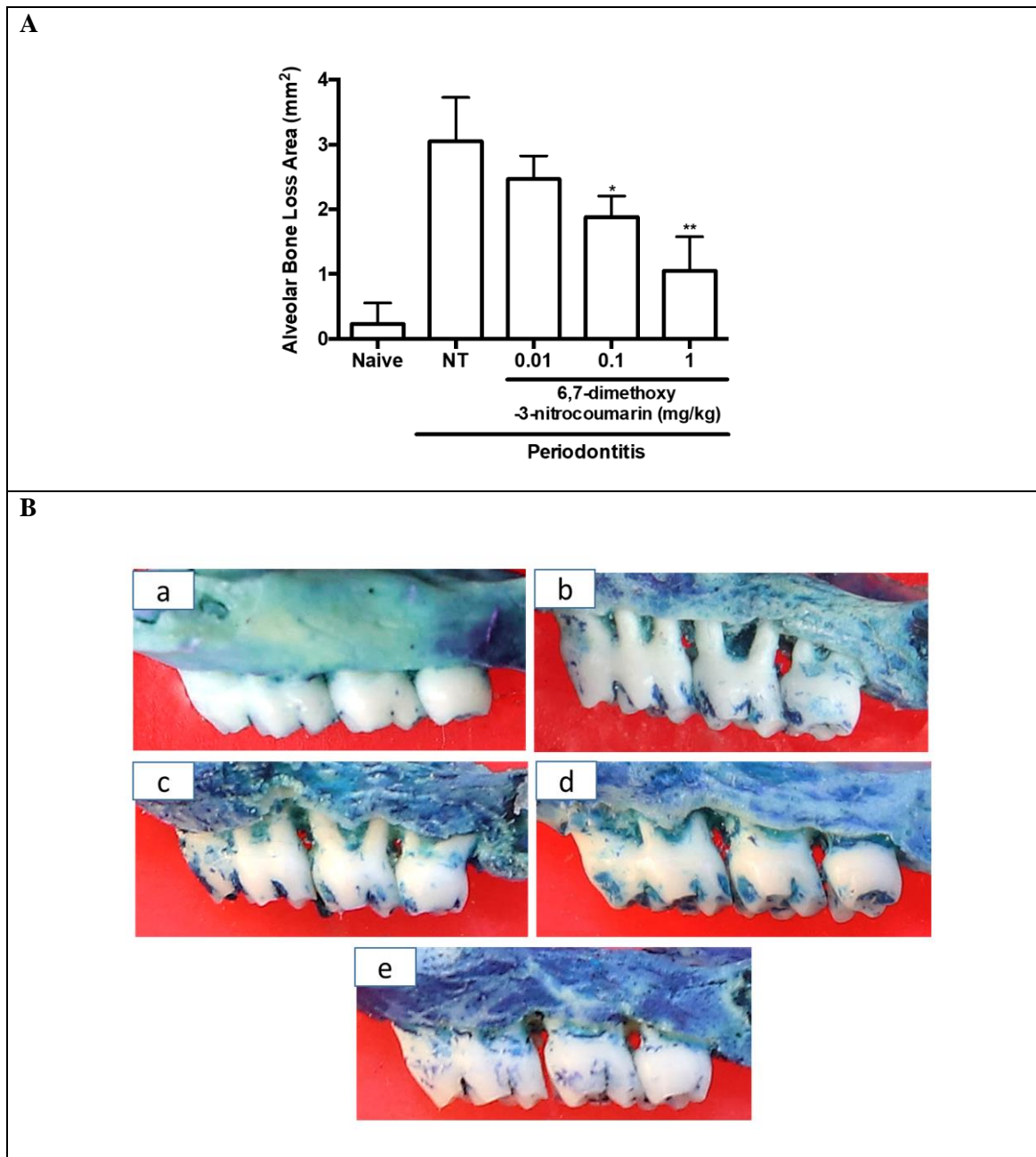


Fig. 2. (A) Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01; 0.1 or 1 mg/kg) on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. Naive: rats not submitted to periodontitis induction. NT (not-treated): rats submitted to periodontitis induction and treated (*oral gavage*) with vehicle (saline solution + 0.1% ethanol) for 11 days. 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (mg/kg): rats submitted to periodontitis induction and treated (*oral gavage*) with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01; 0.1 or 1 mg/kg) for 11 days. Data are shown as mean \pm SEM (n = 6 for each treatment). * P < 0.01 versus NT; ** P < 0.0001 versus NT (ANOVA, Tukey). **(B) Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01; 0.1 or 1 mg/kg) on the macroscopic view of periodontium.** (a) normal maxilla (naive), showing the integrity of its components (b) maxilla from rat submitted to periodontitis and receiving only vehicle presenting severe bone loss. (c-d-e) maxilla from rats submitted to periodontitis and treated with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (0.01; 0.1 or 1 mg/kg, respectively) preservation of the alveolar process.

Figure 3:

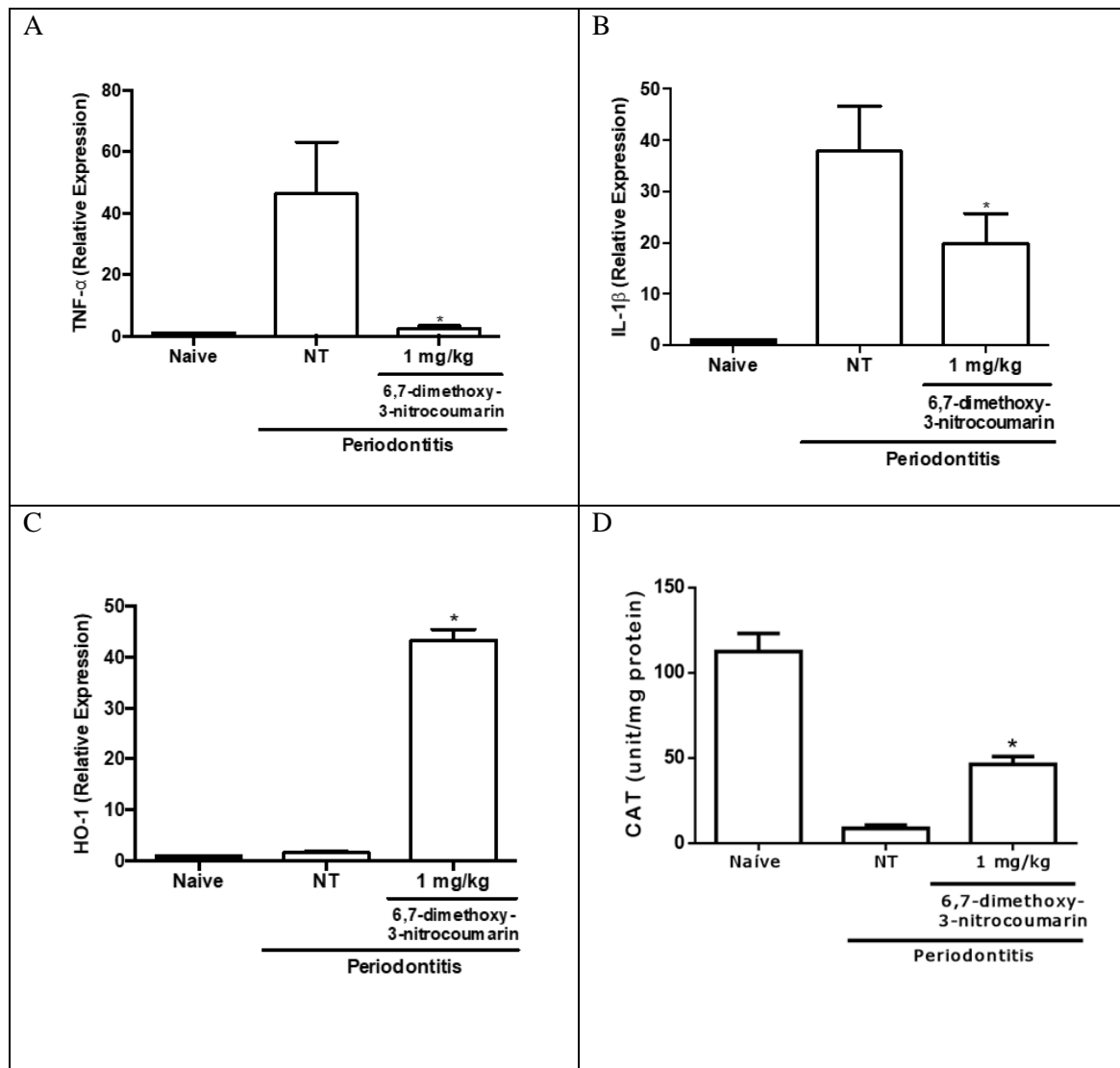


Fig. 3. Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) on the mRNA levels of TNF- α (A), IL1- β (B), and HO-1 (C) in gingival tissues in ligature-induced periodontitis in rats. (D): Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) on catalase activity in gingival tissues in ligature-induced periodontitis in rats. Naive: rats not submitted to periodontitis induction. NT (not-treated): rats submitted to periodontitis induction and treated (*oral gavage*) with vehicle (saline solution + 0.1% ethanol) for 11 days. 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (mg/kg): rats submitted to periodontitis induction and treated (*oral gavage*) with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarine (1 mg/kg) for 11 days. Data are shown as mean \pm SEM (n = 6 for each treatment) (ANOVA; Tukey). (A) * P<0.0003 versus NT; (B) * P<0.0060 versus NT; (C) * P<0.0001 versus NT; (D) * P<0.014 versus NT.

Table 1. Description of biomarkers, gene, primer sequences, and NCBI accession numbers.

Biomarkers	Gene	Primer sequence (5'-3')	NCBI
Inflammatory modulators	<i>Tnf-α</i>	S-CGGGGTGATCGGTCCCAACAAG A-GTGGTTTGCTACGACGTGGGC	NM_012675.3
	<i>Il-1-β</i>	S-TGCTGTCTGACCCATGTGAG A-CCAAGGCCACAGGGATTTG	NM_031512.2
Antioxidant marker	<i>Ho-1</i>	S-ACAGCATACGTAAAGCGTCTCCA/ A-CATGGCCTTCTGCGCAATTCTTCTT	NM_012580.2
Reference gene	<i>Gapdh</i>	S-GGACCAGGTTGTCTCCTGTG/ A-CATTGAGAGCAATGCCAGCC	NM_017008.4

Table 2: Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin treatment in serum biomarkers in rats submitted to periodontitis.

Serum biomarkers	Naive	NT	6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg)
AST (U/I)	54.95 ± 5.32	68.04±12.3	63.50±8.03
ALT (U/I)	41.85 ± 5.02	42.2±3.49	33.32±2.01
TALP (U/I)	98.82±6.70	67.42±13.75	67.96±12.55
Creatinine (U/I)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02

Naive: rats not submitted to periodontitis induction. NT (not-treated): rats submitted to periodontitis induction and treated (oral gavage) with vehicle (vehicle (0.9% saline + 0.1% ethanol) for 11 days. 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg): rats submitted to periodontitis induction and treated (oral gavage) with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) for 11 days. The data represent the mean ± S.E.M. (n = 6 for each treatment). P > 0.05. ANOVA, Tukey.

Table 3: Effect of 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin treatment on histopathological (H&E) analysis of stomach, liver and kidney

Organs / Histopathological Parameters	Groups		
	Naive	NT	6,7-dimethoxy-3- nitrocoumarin
Stomach			
Loss of epithelial cells	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-2)
Vascular congestion	1 (0-1)	1 (1-1)	1 (1-1)
Hemorrhagic damage	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Edema	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (1-1) *
Inflammatory cells	0 (0-1)	1 (1-2)	1 (1-2)
Liver			
Loss of epithelial cells	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (1-2) *
Vascular congestion	0 (0-1)	2 (1-2) *	0 (0-1)
Hemorrhagic damage	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (1-1)
Edema	0 (0-1)	1 (1-2)	1 (1-2)
Inflammatory cells	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
Kidney			
Loss of epithelial cells	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
Necrosis	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-0)
Hemorrhagic damage	0 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-2)
Edema	0 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)
Inflammatory cells	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

NT (not-treated): rats submitted to periodontitis induction and treated (oral gavage) with vehicle (vehicle (0.9% saline + 0.1% ethanol) for 11 days. 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg): rats submitted to periodontitis induction and treated (oral gavage) with 6,7-dimethoxy-3-nitrocoumarin (1 mg/kg) for 11 days. The data represent the mean \pm S.E.M. (n = 6 for each treatment). P > 0.05. ANOVA, Tukey.

7 CONCLUSÃO

- O derivado semissintético 6, 7- dimetox-3-nitrocumarina foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar no modelo de periodontite em ratas ao promover a redução dos níveis de reabsorção óssea analisados pela morfometria e histopatologia (H&E);
- O derivado semissintético 6, 7- dimetox-3-nitrocumarina (1 mg/kg) reduziu a quantidade de radicais de oxigênio ao elevar os níveis da enzima antioxidante catalase;
- O derivado semissintético 6, 7- dimetox-3-nitrocumarina (1 mg/kg) reduziu a expressão dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL1- β e elevou a expressão de HO-1 no tecido gengival de ratas submetidas a periodontite;
- O derivado semissintético 6, 7- dimetox-3-nitrocumarina (1 mg/kg) durante 11 dias não afetou parâmetros bioquímicos e análise microscópica dos órgãos dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. Y.; AHMAD, I. M.; SWITZER, B.; BRITIGAN, B. E. Induction of heme oxygenase-1 contributes to survival of *Mycobacterium abscessus* in human macrophages-like THP-1 cells. **Redox Biology**, Omaha, v. 4, n. 2015, p. 328-39, Apr. 2015.
- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 394, n. 1-2, p. 49-54, Aug. 2013.
- AGGARWAL, B. B.; HENZEL, W. J.; MOFFAT, B.; KOHR, W. J.; HARKINS, R. N. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, Texas, USA, v. 260, n. 4, p. 2334–2344, Feb, 1985.
- AGGARWAL, B. B.; KOHR, W. J.; HASS, P. E.; MOFFAT, B.; SPENCER, S. A.; HENZEL, W. J.; BRINGMANS, T. S.; NEDWINS, G. E.; GOEDDELS, D. V.; HARKINS, R. N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, Texas, USA, v. 260, n. 4 p. 2345–2354. Feb, 1985.
- AGGARWAL, B. B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, California, USA, v. 259, n. 1, p. 686–691, Jan, 1984.
- AGHALOO, T. L.; Kang, B.; SUNG, E C; SHOFF, M.; RONCONI, M.; Gotcher, J. E.; Bezouglaia, O.; DRY, S. M.; TETRADIS, S. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**. Los Angeles, USA, v. 26, n. 8, p. 1871-1882, Aug, 2011.
- ALGATE, K.; HAYNES, D.R.; BARTOLD, P.M.; CROTTI, T.N.; CANTLEY, M.D. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. **Journal of Periodontal Research**, Adelaide, Australia, v. 51, n. 5, p. 549-566, Oct, 2016.
- ARANCIBIA, R.; OYARZUN, A.; SILVA, D.; TOBAR, N.; MARTINEZ, J.; SMITH, P. C. Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, Santiago, Chile, v. 84, n. 5, p. 683–693, May, 2013.
- ARANHA, A. M. F., REPEKE, C. E., GARLET, T. P., VIEIRA, A. E., CAMPANELLI, A. P., TROMBONE, A. P. F., LETRA, A.; SILVA, R. M.; GARLET, G. P. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. **Journal of endodontics**, Chicago, v. 39, n. 1, p. 83-p.87, Jan. 2013.
- B, HOLTFRETER; ALBANDAR, J.M.; DIETRICH, T.; DYE, A.B.; EATON, K.A.; EKE, P.I.; PAPAPANOU, P.N.; KOCHER, T. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: proposed standards from

the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. **J Clin Periodontol.** v.42, n.5. p.407–412. Maio, 2015.

BALTACIOGLU, E.; YUVA, P.; AYDIN, G.; ALVER, A.; KAHRAMAN, C.; KARABULUT, E.; AKALIN, F. A. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: A New Biomarker for Periodontal Disease? **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 10, p. 1432–1441, 2014.

BARTON, D.; OLLIS, W. D. **Comprehensive organic chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds.** Volume 4- 1st ed. United Kingdom: Pergamon Press, p. 1205. 1979.

BASSO, F. G.; PANSANI, T. N.; TURRIONI, A. P. S.; SOARES, D. G.; COSTA, C. A. S.; HEBLING, J. Tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing. **Journal of Periodontology**, São Paulo, v. 87, n. 8, p. 990-996, Aug, 2016.

BECK, J.D.; PAPAPANOU, P.N.; PHILIPS, K.H.; OFFENBACHER, S. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. **J Dent Res.** v.98, n.10, p.1053-1062. 2019.

BENAKANAKERE, M.; KINANE, D. F. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. **Periodontal Disease.** Philadelphia, USA, v.15, n. 1, p.41-55, Jan, 2012.

BETTEGA, P. V. C.; CZLUSNIA, G. R.; PIVA, R.; NAMBA, E. L.; RIBAS, C. R.; GRÉGIO, A. M. T. Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. **Archives of Oral Research**, Paraná, v. 7, n. 1, p. 89-97, Jan/Apr. 2011.

BEZERRA, M. M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R.; ROCHA, F. A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Fortaleza, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, Jun. 2000.

BILGIN, H. M.; ATMACA, M.; OBAY, B. D.; ÖZEKINCI, SEMI, E. KE NI, A. Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. **Experimental and toxicologic pathology**, [s.l.], v. 63, n. 95 4, p. 325-330, May 2011.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Res.** Kansas, USA, v. 26, n. 2, p. 229–238. Feb. 2011.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229–239, Jan. 2010.

BUCKWALTER, J. A.; GLIMCHER, M. J.; COOPER, R. R.; RECKER, R. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instructional Course Lectures**, USA, v. 45, n. 16, p. 371-386, Jan. 1996.

CARDOSO-LOPES, E.M.; CARREIRA, R.C.; AGRIPINO, D.G.; TORRES, L.M.B.; CORDEIRO, I.; BOLZANI, V.S.; et al. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest: Ilha do Cardoso State Park. **Rev. Bras. Farmacogn.** São Paulo. v. 18, supl. p.655–660. Dez. 2008.

- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, v.72, p.3666–3670, 1975.
- CEKICI, A.; KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology** 2000. Istanbul, TUR. v. 64, n. 1, p. 57-80, February, 2014.
- CHEN, J. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. **Reviews in the Neurosciences**, Columbia, v. 25, n. 2, p. 269–280, Feb, 2014.
- CHEN, K.; GUNTER, K.; MAINES, M. D. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 75, n. 1, p. 304-313, Jul. 2000.
- CHIU, A. V.; SAIGH, M. A.; MCCULLOCH, C. A.; GLOGAUER, M. The role of NrF2 in the regulation of periodontal health and disease. **Journal of Dental Research**, Toronto, Canada. v. 96, n. 9, p. 975-983, June, 2017.
- CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. **Immunotherapy**, [s.l.], Philadelphia, USA, v. 4, n. 4, p. 425-441, Apr. 2012.
- DAHIYA, P.; KAMAL, R.; GUPTA, R.; BHARDWAJ, R.; CHAUDHARY, K.; KAUR, S. Reactive oxygen species in periodontitis. **Journal of Indian Society Periodontology**, Paonta Sahib, India v. 17, n. 4, p. 411-416, Jul-Aug. 2013.
- DATTA, H. K., NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. THE cell biology of bone metabolism, **Journal of Clinical Pathology**, Newcastle upon Tyne, UK. v. 61, n. 5, p. 577–587, April, 2008.
- DEGUCHI, T.; ALANNE, M. H.; FAZELI, E.; FAGERLUND, K. M.; PENNANEN, P.; LEHENKARI, P.; HANNINEN, P. E.; PELTONEN, J.; NÄREOJA, T. In vitro model of bone to facilitate measurement of adhesion forces and super-resolution imaging of osteoclasts. **Scientific reports**, Londres, v. 6, n. 22585, Mar. 2016.
- DELIMA, A.J.; VAN DYKE, T.E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology** 2000. v. 31, p.55–76. Feb. 2003
- DÍAZ-ZÚNIGA, J.; MONASTERIO, G.; ALVAREZ, C.; MELGAR-RODRÍGUEZ, S.; BENÍTEZ, A.; CIUCHI, P.; GARCIA, M.; ARIAS, J.; SANZ, M.; VERNAL, R. Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of aggregatebacter actinomycetemcomitans or porphyromonas gingivalis is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. **Journal of Periodontology**. Santiago, Chile, v. 86 n. 1, p. 108-119, Jan, 2015.
- DING, C.; JI, X.; CHEN, X.; XU, Y.; ZHONG, L. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. **J. Clin. Periodontol.**, v.41, p.748–759, 2014.
- DOWNEY, P.A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Physical Therapy**, Pittsburgh, USA, v. 86, n. 1, p. 77–91, Jan. 2006.
- EBERSOLE, J. L.; KIRAKODU, S.; NOVAK, M.J.; STROMBERG, A.J.; SHU SHEN, L.O.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; BURGOS, A.; GONZALEZ, O. A. Cytokine gene

expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** Kentucky, USA, v.41, p.853–861, Sep. 2014.

EI-KHASSAWNA, T.; E.; MERBOTH, F.; MALHAN, D.; BOCKER, W.; DAGHMA, D. E. S.; STOETZEL, S.; KERN, S.; HASSAN, F.; ROSENBAUM, D.; LANGENSTEIN, J.; BAUER, N.; SCHLANGENHAUF, A.; ROSEN-WOLFF, A.; SCHULZE, F.; RUPP, M.; HOSE, D.; SECKLINGER, A. IGNATIUS, A.; WILKE, H. J.; LIPS, K. S.; HEISS, C. Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis. **The American Journal of Pathology.** Giessen, Germany, v. 187, n. 8, p.1-15, Aug, 2017.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** Oslo, v. 11, n. 4, p. 219-227, Dec. 2010.

FALCÃO, M. J. C.; POULIQUEM, Y. B. M.; LIMA, M. A. S.; GRAMOSA, N. V.; COSTALOTUFO, L. V.; MILITÃO, G. C. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of natural products**, Washington, v. 68, n. 3, p. 423-426, Feb. 2005.

FALCÃO, M.J.C. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste *Platymiscium floribundum* Vog. (Leguminosae).** 2003. Tese (Doutorado em Química Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2003.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, Massachusetts, USA, v. 9, n. 6, p. 482–493, May, 2010.

FERES, M.; TELES, F.; TELES, R.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. **Periodontology 2000.** São Paulo, v. 72, n. 1, p. 30–53. Oct. 2016.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G.R.S.; CERRI, E.S.; SIMÕES, M.; CERRI, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research Internacional.** São Paulo, Brazil, n. 421746, p.1-17. Jun. 2015.

FREIRE, J. M. O.; CHAVES, H. V.; TEIXEIRA, A. H.; SOUSA, L. H. T.; PINTO, I. R.; NASCIMENTO COSTA, J. J.; SOUSA, N. A.; PEREIRA, K. M. A.; GIRÃO, V. C. C.; FERREIRA, V. C. S.; SANTOS, J. E. A.; LIMA, M. A. S.; PIMENTA, A. T. A.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. E. A.; PINTO, V. P. T.; CRISTINO-FILHO, G. BEZERRA, M. M. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. **PLoS ONE**, Sobral, v. 14, n. 11, p. Nov. 2019

FREIRES, I.A.; SANTAELLA, G.A.; SARDI, J.C.O.; ROSALEN, P.L.; The alveolar bone protective effects of natural products: a systematic review. **Arch. Oral Biol.** Gainesville, USA, v. 87, p.196-p203. Mar. 2018.

FRENCKEN, J.E.; SHARMA, P.; STENHOUSE, L.; GREEN, D.; LAVERTY, D.; DIETRICH T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **J Clin Periodontol.** v.44, supl. 18. p94–105. Mar, 2017.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.I.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics.** Sapporo, Japan. v. 100, n. 2, p.171-194, Nov, 2003.

- FUJIHARA, R.; USUI, M.; YAMAMOTO, G.; NISHII, K.; TSUKAMOTO, Y.; OKAMATSU, Y.; SATO, T.; ASOU, Y.; NAKASHIMA, K.; YAMAMOTO, M. Tumor necrosis factor- α enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. **Journal of Periodontal Research**, Tokyo, Japan, v. 49, n. 4, p. 508–517, Aug, 2014.
- GAFFEN, S.L.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/ Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. **J Dent Res**. New York, v. 87, n.9, p.817–828. Sep. 2008.
- GALKIN, A.; FALLARERO, A.; VUORELA, P. M. Coumarins permeability in Caco-2 cell model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Turku, v. 61, n. 2, p. 177-184, Feb. 2009.
- GAO, A.; WANG, X.; YU, H.; LI, N.; HOU, Y.; YU, W. Effect of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (Pg-LPS) on the expression of EphA2 in osteoblasts and osteoclasts. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**. Changchun, Jilin. v. 52, n. 2, p. 228-234. February, 2016.
- GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, Bauru, São Paulo, v. 89, n. 12, p.1349–1363, Dec, 2010.
- GLOWACKI AJ.; YOSHIKAWA, S.; JHUNJHUNWALA, S.; VIEIRA, A. E.; GARLET, G. P.; SFEIR, C.; LITTLE, S. R. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Pittsburgh, v. 110, n. 46, p. 18525-18530, Nov. 2013.
- GOES, P.; MELO, I. M.; DUTRA, C. S.; LIMA, A. P. S.; LIMA, V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Archives of oral biology**, [s.l.], Fortaleza, Brazil. v. 57, n. 11, p. 1537-1544, Nov. 2012.
- GOLUB, L. M.; RYAN, M. E.; WILLIAMS, R. C. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. **Dentistry today**, Nova Jersey, v. 17, n. 10, p. 102-6, 108-9, Oct. 1998.
- GÓRSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALINSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, Warsaw, Poland, v. 30, n. 12, p. 1046-1052, Dec, 2003.
- GOTSMAN, I.; LOTAN, C.; SOLSKONE, W.A.; RASSOVSKY, S.; PUGATSCH, T.; LAPIDUS, L.; NOVIKOV, Y.; MASRAWA, S.; STABHOLZ, A. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. **J. Periodontol**. Jerusalem, Israel, v.78, n. 5, p.849–858. May. 2007.
- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, Boston, v.79, n.8 [supl], p.1585–1591, Aug, 2008.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**. Philadelphia, USA, v. 3, n. 1, p. 1-15, Jan, 2011.

HAIJSHENGALLIS G, CHAVAKIS T. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. **Trends Immunol**. Philadelphia, USA, v. 34, n.1, p.1–6, Jan. 2003.

HAIJSHENGALLIS G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**. Philadelphia.v.15, n.1. p.30–44, Jan. 2015.

HAIJSHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 3-11, Jan. 2014.

HASEGAWA, H. MIZOGUCHI, Z; CHIBA, Y.; OHASHI, M.; XU, M.; YOSHIMOTO, T. Expanding diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. **Frontiers in Immunology**. Tokyo, Japan, v. 7, n. 8 p.479, Nov, 2016.

HAYASHI, S.; TAKAMIYA, R.; YAMAGUCHI, T.; MATSUMOTO, K.; TOJO, S. J.; TAMATANI, T.; KITAJIMA, M.; MAKINO, N.; ISHIMURA, Y.; SUEMATSU, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circulation Research**, Tokyo, v. 85, n. 8, p. 663-671. 1999.

HENNEMAN, S.; REIJERS, R. R.; MALTHA, J. C.; VON DEN HOFF, J. W. Local variations in turnover of periodontal collagen fibers in rats. **Journal of Periodontal Research**, Nijmegen, v. 47, n. 3, p. 383–388, Jun. 2012.

HENZ RYEN, A.; BACKLUND, A. Charting Angiosperm Chemistry: Evolutionary Perspective on Specialized Metabolites Reflected in Chemical Property Space. **Journal of Natural Products**, Uppsala, v. 82, n. 4, p. 798–812, Mar. 2019.

HIENZ, S.A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**. Gold Coast, Australia, v. 2015, n. esp., p. 1-10, June, 2015.

HOFBAUER, L.C.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; SPELSBERG, T.C.; RIGGS, B.L.; KHOSLA, S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. **Bone**, California, USA, v. 25, n. 3, p. 255-259, Sep, 1999.

INOUE, S.; SUZUKI, M.; NAGASHIMA, Y.; SUZUKI, S.; HASHIBA, T.; TSUBURAI, T.; IKEHARA, K.; MATSUSE, T.; ISHIGATSUBO, Y. Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice, **Human Gene Therapy**, Tsukuba, v. 12, n. 8, p. 967-979. May, 2001.

IRANSHAHI, M.; ASKARI, M.; SAHEBKAR, A; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, Mashhad, v. 17, n. 2, p. 99-103, Jun. 2009.

- GUYOT, M. M. Perspectivas de la fitoterapia. **Acta. Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 9, n.2, p. 131-138, May. 1990.
- ISHI, E. P. BERTOLO, M. B; ROSSA JUNIOR, C.; KIRKWOOD, K. L.; ONOFRE, M. A. Periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis. **Brazilian Oral Reseach**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 72-77, Jan-Mar, 2008.
- ISHIHARA, Y.; NISHIHARA, T.; KUROYANAGI, T.; SHIROZU, N.; YAMAGISHI, E.; OHGUCHI, M.; KOIDE, M.; UEDA, N.; AMANO, K.; NOGUCHI, T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. **Journal of Periodontal Research**, Nagoya, Japan, v. 32, n. 6, p. 524-529, Aug, 1997.
- JEFFCOAT, M. K.; HAUTH, J. C.; GEURS, N.C.; REDDY, M.S.; CLIVER, S.P.; HODGKINS, P.M.; GOLDENBERG, R.L. Periodontal disease and preterm birth: results of a pilot intervention study. **J. Periodontol.** Birmingham, USA, v.74, n.8, p.1214–1218. Aug. 2003.
- JONES, B. E.; MAERZ, M. D.; BUCKNER, J. H. IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, Seattle, USA, v. 55, n. esp, p.9–14, Dec, 2018.
- KAJIKAWA, T.; MESHIKHES, F.; MAEKAWA, T.; HAJISHENGALLIS, E.; HOSUR, K. B.; ABE, T.; MOSS, K.; CHAVAKIS, T.; HAJISHENGALLIS, G. Milk fat globule epidermal growth factor 8 inhibits periodontitis in non-human primates and its gingival crevicular fluid levels can differentiate periodontal health from disease in humans. **Journal of clinical periodontology**, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 472-483, Feb. 2017.
- KASSEBAUM, N.J.; BERNABE, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C.J.; MARCENES, W. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: A systematic review and meta-regression. **J Dent Res.** v.93, n.11. p.1045–1053. Nov. 2014.
- KASSEBAUM, N.J.; SMITH, A.G.C.; BERNABÉ, E.; FLEMING, T.D.; REYNOLDS, A.E.; VOS, T.; MURRAY, C.J.L.; MARCENES et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. **J Den Res.** London, v. 96. n. 4, p. 380-387, Feb. 2017.
- KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONCALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; LI, Y-P.; MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W.O.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **The American Journal of Pathology**, Massachusetts, USA, v. 169, n. 3, p. 987–998, Sep, 2006.
- KEYSE, S.M.; TYRRELL, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Epalinges, v. 86, n. 1, p. 99-103, Jan. 1989.
- KIKUCHI, T.; MATSUGUCHI, T.; TSUBOI, N.; MITANI, A.; TANAKA, S.; MATSUOKA, M.; YAMAMOTO, G.; HISHIKAWA, T.; NOGUCHI, T.; YOSHIKAI, YASUNOBU. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by

- lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. **The Journal of Immunology**. Nagoya, Japan, v. 166, n. 5, p. 3574-3579, March, 2001.
- KINANE, D.F.; STATHOPOULOU, P.G.; PAPAPANOU, P.N. Periodontal diseases. **Nat Rev Dis Primers**. Filadélfia, v. 3 n. 17038, Jun, 2017.
- KINGSBURY, W.D.; BOEHM, J. C.; JAKAS, D. R.; HOLDEN, K. G.; HECHT, S. M.; GALLAGHER, G.; CARANFA, M. J.; MCCABE, F. L.; FAUCETTE, L. F.; JOHNSON, R. K.; HERTZBERG, R. P. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl) camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Pennsylvania, v. 34, n. 1, p. 98-107, Jan. 1991.
- KINNEY, J. S.; RAMSEIER, C. A.; GIANNOBILE, W. V. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. **Ann NY Acad Sci**, Michigan. v. 1098, n. 1, p.230-251, ap. 2007.
- CHINNAIYAN, A.; REMICK, D. G. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. **Shock**, New York, v. 21, n. 1, p. 26-30, Jan. 2004.
- KONG, L. L.; HU, M.; ZENG, T. H.; WU, RAN.; JIANG, R.; WEI, J.; WANG, L.; KONG, J.; CHEN, Y. Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets. **Chinese Pharmacological Bulletin**, Tianjin, v. 28, n. 33, p. 12364–12372, Jul. 2012.
- CHINNAIYAN, A.; REMICK, D. G. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. **Shock**, New York, v. 21, n. 1, p. 26-30, Jan. 2004.
- KONG, L. L.; HU, M.; ZENG, T. H.; WU, RAN.; JIANG, R.; WEI, J.; WANG, L.; KONG, J.; CHEN, Y. Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets. **Chinese Pharmacological Bulletin**, Tianjin, v. 28, n. 33, p. 12364–12372, Jul. 2012.
- KORNMAN, K.S.; PAPAPANOU, P.N. Clinical application of the new classification of periodontal diseases: Ground rules, clarifications and "gray zones". **J Periodontol**. Michigan, v.91, n.3, p.352-360. Mar. 2020.
- KOSTOVA, I. Studying plant derived coumarins for their pharmacological and therapeutic properties as potential anticâncer drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 1605-1618, Dec. 2007.
- LACEY, D.L.; TIMMS, E.; TAN, H.-L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y.-X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell Press**. California, USA, v.93, n.2, p. 165-176, Ap, 1998.
- LALLAM-LAROYE, C.; ESCARTIN, Q.; ZLOWODZKI, A-S.; BARRITAU, D.; CARUELLE, J-P.; BAROUKH, B.; SAFFAR, J-L.; COLOMBIER, M-L. Periodontitis destructions are restored by synthetic glycosaminoglycan mimetic. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Montrouge, v.79A, n. 3, p. 675–683, Dec. 2006.

LEE, E. M.; LEE, Y. E.; LEE, E.; RYU, G. R.; KO, S. H.; MOON, S-D.; SONG, K-H.; AHN, Y-B. Protective effect of heme oxygenase-1 on high glucose-induced pancreatic beta-cell injury. **Diabetes & Metabolism Journal**, Seoul, v. 35, n. 5, p. 469-479, Oct. 2011.

LI, J.; ZHANG, F.Q.; DU, Z.N.; CAI, T.; CAI, P.S.; FAN, L. Protective effect of HO-1 transfection against ethanol-induced osteoblast damage. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, Zhengzhou, China, v. 35, p. 374-377, jun. 2015

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; DE MENEZES ALENCAR, V. B.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A. C; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental 484 periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Sciences**, Fortaleza, v. 108, n. 2, p. 123-129. Apr. 2000.

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T.; MELO, J. P. L. C.; FERREIRA, R. C. D. Q.; SILVEIRA, E. J. D. D.; DANTAS, E. M. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco- Maxilo-Facial**, Pernambuco, v. 7, n. 2, p. 29-36, June 2007.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man. **Journal of periodontology**, California, v. 46, n. 11, p. 677-680, Nov. 1975.

LISTL, S.; GALLOWAY, J.; MOSSEY, P.A.; MARCENES, W. 2015. Global economic impact of dental diseases. **J Dent Res**. Heidelberg, Germany, v.94, n.10, p.1355–p.1361. Aug, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009.

MADDEN, T. E.; CATON, J. G. Animal models for periodontal disease. **Methods in Enzymology**; Olympia, v. 235, p. 106- 119. 1994

MADUREIRA, D. F.; LIMA, I. L. A.; COSTA, G. C.; LAGES, E. M. B.; MARTINS, C. C.; SILVA, T. A. Tumor necrosis factor-alpha in gingival crevicular fluid as a diagnostic marker for periodontal diseases: a systematic review. **Journal of Evidence Based Dental Practice**. Belo Horizonte, MG, v. 18, n. 4, p. 315–331, Dec, 2018.

MARCHESAN, J.; GIRNARY, M. S., JING, L.; MIAO, M. Z.; ZHANG, S.; SUN, L.; MORELLI, T.; SCHOENFISCH, M. H.; INOHARA, N.; OFFENBACHER, S.; JIAO, YIZU. An Experimental Murine Model to Study Periodontitis. **Nature Protocols**, North Carolina, v. 14, n. 10, p. 2247-2267, Oct. 2018.

MARTINS, C. S.; LEITÃO, R. F. C.; COSTA, D. V. S.; MELO, I. M.; SANTOS, G. S.; LIMA, V.; BALDIM, V.; WONG, D. V. T.; BONFIM, L. E.; MELO, C. B.; OLIVEIRA, M. G.; BRITO, G. A. C. Topical HPMC/S-nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. **PLoS ONE**, Fortaleza, v. 11, n. 4, p. 1-19, Apr. 2016.

MARTINS, M. C. A.; NETA, M. C. A. F.; LANDIM, J. R.; GURGEL, H. M., NUTO, S. A. S.; BRAGA, J. U. Fatores de Risco associados à doença periodontal em uma comunidade nordestina de baixa renda. **Brazilian Journal of Periodontology**, Fortaleza, v. 22, n. 3, p. 47-53, Set. 2012.

MASI S.; SALPEAC, K. D.; LIC, K.; PARKARD, M.; NIBALID, L.; DONOSD, N.; PATELD, K.; TADDEIB, S.; DEANFIELDA, J. E.; D'AIUTOD, F.; HUMPHRIES, S.

E. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis. **Free Radical Biology and Medicine**, London, v. 50, n. 6, p. 730-735. Mar. 2011.

MCNALLY, S. J.; HARRISON, E. M.; ROSS, J. A.; GARDEN, O. J.; WIGMORE, S. J. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury. **Transplantation**, Edinburgh, v. 81, n. 4, p. 623-626. Feb. 2006.

MILITÃO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.; CURI, R. et al. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci**. Fortaleza. v.78, n.20. p.2409–2417. Abril, 2006.

MIRANDA, L. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **The American journal of pathology**, Filadélfia, v. 169, n. 3, p. 987-998, Sep. 2006.

MIROUSE, A.; SEROR, R.; VICAUT, E.; MARIETTE, X.; DOUGADOS, M.; FAUCHAIS, A.L.; DEROUX, G.; DELLALH, A.; COSTEDOAT-CHALUMEAU N.; DENIS, G.; SELLAM, J.; ARLETN, J-B.; LAVIGNEO, C.; URBANSKIO, G.; FISCHER-DUMONT, D.; DIALLOD, A.; FAINA, O.; MÉKINIANA, A. Arthritis in primary Sjogren's syndrome: Characteristics, outcome and treatment from French multicenter retrospective study. **Autoimmunity Reviews**, Paris, France, v. 18, n. 1 p. 9-14, 2018.

MONSARRAT, P.; BLAIZOT, A.; KÉMOUN, P.; RAVAUD, P.; NABET, C.; SIXOU, C.; M, VERGNES, M.; JN. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. **J Clin Periodontol**. Toulouse. V.43, n. 5. p.390–400. May, 2016.

MONTELLANO, O. B.; Empirical Aztec Medicine. **Science**, New York, v. 188, n. 4185, p. 215-20, May. 1975.

MOULTON, R. V., Chapter 17 – Cytokines. In: TSOKOS, G. C. (Org). Systemic Lupus Erythematosus - Basic, Applied and Clinical Aspects. **The Journal of Rheumatology**, Carolina, USA, v. 43, n. 11, p. 2087, Nov, 2016.

MURAKAMI, M.; KAMIMURA, D.; HIRANO, T. Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines. **Immunity**. Sapporo, Japan, v. 50, n. 4, p. 812–831, Ap, 2019.

NADJA S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J.; BEVILAQUA, C. M.; RONDON, F.; WILSON, M. E.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, H. F. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n. 11, p. 1164-1168, Nov. 2012.

NAGASAWA, T.; KIJ, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; LU, H.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHY, G.; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontology 2000**. Hokkaido, Japan. v. 43, n. 1, p. 65-84, Feb, 2007.

NAKASHIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; YAMASAKI, S.; KAWAKAMI, A.; EGUCHI, K.; SASAKI, H.; SAKAI, H. Protein expression and functional difference of membrane e-bound and soluble receptor of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nagasaki, Japan, v. 275, n. 3, p. 768-775, Sep. 2000.

NDISANG, J. F.; JADHAV, A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, Saskatchewan, v. 296, n. 4, p. E829-E841, Apr. 2009.

NEEDLEMAN, I.; GARCIA, R.; GKRIANAS, N.; KIRKWOOD, K.L.; KOCHER, T.; IORIO, A.D.; et al. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. **J Periodontol**. v. 89, sup. 1. p120–139. Jun, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Pennsylvania, v. 79, n. 6, p. 629-661, Feb. 2016.

NITTI, M.; PIRAS, S.; MARINARI, U. M.; MORETTA, L.; PRONZATO, M. A.; FURFARO, A. L. HO-1 induction in cancer progression: a matter of cell adaptation. **Antioxidants**, Genoa, v. 6, n. 2, p. 29-49, May. 2017.

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KIERSZENBAUM, B. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 720p.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of periodontology**. Chicago, v. 79, n. 8S, p. 1569-1576, Aug. 2008.

OHE, J. Y.; KWON, Y. D.; LEE, H. W. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived. **Clinical Oral Investigations**. Seoul, Republic of Korea, v. 16, n. 4, p. 1153-9, Aug, 2012.

OKTAY, S.; CHUKKAPALLI, S. S.; RIVERA-KWEH, M. F.; VELSKO, I. M.; HOLLIDAY, L. S.; KESAVALU, L. Periodontitis in Rats Induces Systemic Oxidative Stress That Is Controlled by Bone-Targeted Antiresorptives. **Journal Periodontol**, Flórida, v. 86, n. 1, p. 137-145, Jan. 2015.

OLIVEIRA, J. S.; PINTO, M. E S.C.; SANTANA, L. DE A. DE B.; A.S.B. PINTO.; DI LENARDO, D.; VASCONCELOS, D.F.P. Biological effects of medicinal plants on induced periodontitis: a systematic review. **Int J Dent**. Piauí, Brazil, 2016: 3719879. p.1-p10. Sep. 2016.

OTTERBEIN, L.E.; BACH, F.H.; ALAM, J.; SOARES, M.; TAO LU, H.; WYSK, M.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A.; CHOI, A. M. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway, **Nature Medicine**, New Haven, v. 6, n. 4, p. 422–428. Apr. 2000.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Lexington, v. 2011, n. 2011, p. 1-8, Feb. 2011.

PAPAPANOU, P.N.; LINDHE, J.; STERRETT, J.D.; ENEROTH, L. Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. **J Clin Periodontol.** v. 18, n.8. p.611–615. Set. 1991.

PAPAPANOU, P.N.; SANZ, M, BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, H. F.; FLEMMIG, T. F.; GARCIA, R.; GIANNOBILE, W. V.; GRAZIANI, F.; GREENWELL, H.; HERRERA, D.; KAO, R. T.; KEBSCHULL, M.; KINANE, D. F.; KIRKWOOD, K. L.; KOCHER, T.; KORNMAN, K. S.; KUMAR, P. S.; LOOS, B. G.; MACHTEI, E.; MENG, H.; MOMBELLI, A.; NEEDLEMAN, I.; OFFENBACHER, S.; SEYMOUR, G. J.; TELES, R.; TONETTI, M. S. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J clin Periodontol.** Columbia, New York, v. 45, n. 20, p.162-170, Jun. 2018

Platymiscium floribundum VOG. (Leguminosae). 2003. Tese (Doutorado em Química Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2003.

PONKA, P. Cell biology of heme. **The American Journal of the Medical Sciences,** Quebec, v. 318, n. 4, p. 241-56, Oct. 1999.

RAMS, T.E.; DEGENER, J.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. **J. Periodontol 2000,** Filadélfia, v. 85, n. 1. p. 160–169. Jan. 2014.

RIGHOLT, A. J.; JEVDJEVIC, M.; MARCENES, M.; LISTL, S.; Global-, regional- and country-level economic impacts of dental diseases in 2015. **Journal of Dental Research.** Netherlands, v. 97, n. 5. p. 501–507. Jan 2018.

RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P. E.; SCHNEIDER, G. Counting on Natural Products for Drug Design. **Nature Chemistry,** Zurich, v. 8, n. 6, p. 531-541, Jun. 2016.

ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world Part 1: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses.** 1ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1999.

RYDER, M.I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. **Periodontology 2000.** Cidade, v.53, p.124–137. Jun. 2010.

RYTER, S.W.; ALAM, J.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications, **Physiological Reviews,** Pennsylvania, v. 86, n. 2, p. 583-650, Apr. 2006.

RYTER, W. S. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. **Archives of biochemistry and biophysics,** New York, v. 678, n. 2019, p. 1-11, Dec, 2019.

SALEEM, H.G.M.; SEERS, C.A.; SABRI, A.N.; REYNOLDS, .C.; Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant, **BMC Microbiol.** Austrália. v. 16, n. 214. p. 1-9. Set. 2016.

SANTIN, S.P. **Avaliação Morfológica e Biomecânica dos Efeitos da Radiação Gama em Osso Humano Liofilizado ou Congelado.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2014.

SANZ, M.; VAN WINKELHOFF, A. J. Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, Nova Jersey, v. 38, n. 11, p. 3-6, Feb. 2011

SEHGAL, P. B.; GRIENINGER, G.; TOSATO, G. Regulation of the Acute Phase and Immune Responses. **The New York Academy of Sciences**, New York, v. 557, n. 1, p. 1-50, June, 1989.

SHIN, Y.; CHOUNG, H.; LEE, J.; RHYU, I.; KIM, H. Association of periodontitis with oral cancer: a case-control study. **J Dent Res**. Seoul Korea. v. 98, n.5. p.526–533. May. 2019.

SORSA, T.; GURSOY, U. K.; NWHATOR, S.; HERNANDEZ, M.; TERVAHARTIALA, T.; LEPPILAHTI, J.; GURSOY, M.; KONONEN, E.; EMINGIL, G.; PUSSINEN, P. L.; MÄNTYLÄ, P. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. **Periodontology 2000**. Copenhagen, v. 70, n.1, p. 142-163. Feb. 2016.

SOUSA, L. H.; LINHARES, E. V.; ALEXANDRE, J. T.; LISBOA, M. R.; FURLANETO, F.; FREITAS, R.; RIBEIRO, I.; VAL, D.; MARQUES, M.; CHAVES, H. V.; MARTINS, C.; BRITO, G. A. C.; GOES, P. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid- induced osteoporosis. **Journal periodontol**, Chicago, v. 87, n. 10, p. 1206-1216, May, 2016.

SOUZA, R.B.; GOMES, F.I.F.; PEREIRA, K.M.A.; DUTRA, P.G.P.; CUNHA, R.M.; CHAVES, H.V.; BEZERRA, M. M. Strontium Ranelate Elevates Expression of Heme Oxygenase-1 and Decreases Alveolar Bone Loss in Rats. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, Sobral, v. 9, n. 4, p. e4, Dec. 2018.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia Humana**. 2ed. São Paulo: Mamole, 2001.

STRUILLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. Experimental animal models in periodontology: A review. **The Open Dentistry Journal**, Nantes, v. 4, n. 1, p. 37-47. Feb. 2010.

TAKEUCHI, K.; MATSUMOTO, M.; FURUTA, S.; FUKUYAMA, S.; TAKESHITA, S.; OGATA, T.; SUMA, H.; SHIBATA, S.; SHIMAZAKI, Y.; HATA, Y. Periodontitis is associated with chronic obstructive pulmonary disease. **J Dent Res**. Fukuoka. v.98, n.5. p.534–540. May. 2019.

TAUBMAN, M.; VALVERDE, P.; HAN, X.; KAWAI, T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **Journal of Periodontology**. Boston, v. 76, n. 11S, p. 2033-2041, Nov, 2005.

TEIXEIRA, A. H.; FREIRE, J. M.; DE SOUSA, L. H.; PARENTE, A. T.; DE SOUSA, N. A.; ARRIAGA, A.; SILVA, S. R. L.; MELO, I. M.; SILVA, I. I. C.; PEREIRA, K. M. A.; GOES, P.; COSTA, J. J. N.; CRISTINO-FILHO, C.; PINTO, V. P. T.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M M. *Stemodia maritima* L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. **Frontiers in physiology**, Fortaleza. v. 8, n. 988. Dec. 2017.

TENG, Y. A. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, Canada, [s.l.] v. 14, n. 4, p. 237-252, July, 2003.

- TERAMACHI, J.; INAGAKI, Y.; SHINOHARA, H.; OKAMURA, H.; YANG, D.; OCHIAI, K.; BARBA, R.; MORIMOTO, H.; NAGATA, T.; HANEJI, T. PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo. **Oral Diseases**. Tokushima, Japan. v. 23, n. 2, p.181-188. March, 2017.
- TIWARI, S.; NDISANG, J. F. The heme oxygenase system and type-1 diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, California, v. 20, p. 9, p. 1328-1337. Jul. 2014.
- TOBITA, M.; UYSAL, A. C.; OGAWA, R.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. **Tissue Engineering Part A**, Tokyo, v. 14, n. 6, p. 945-53, Jul. 2008.
- TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; YAMANAKA, R.; KUSANO, H.; AZUMA, T.; SANBE, T.; TAMAKI, N.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **J Periodontol**, Okayama, v. 78, n. 10, p. 1999–2006, 2007.
- TRIVEDI, S.; LAL, N. Antioxidant enzymes in periodontitis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, Lucknow, India, v. 7, n. 1, p. 54-57, Jan-Apr. 2017.
- TSAI, C. C.; CHEN, S.H.; CHEN, S.L.; HO, Y.P.; HO, K.Y.; WU, Y.M.; HUNG, C.C. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, Taiwan, v. 40, n. 5, p. 378–384, 2005.
- UDA, Y.; AZAB, E.; SUN, N.; SHI, C.; PAJEVIC, P. Osteocyte Mechanobiology. **Current Osteoporosis Reports**. Boston, v. 15, n. 4. p.318–325, Aug. 2017.
- UDDIN, G.; RAUF, A.; SIDDIQUI, B.S.; MUHAMMAD, N.; KHAN, A.; SHAH, S.U.A.; RAUF, D.A. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. **Phytomedicine**, Mardan, v. 21, n. 7, p. 954-959, Jun. 2014.
- UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of Antiviral Uses and Other Effects **Journal of Ethnopharmacology**, California, v. 45, n. 1, p. 1-18, Jan. 1995.
- USLU, M.O.; ELTAS, A.; MARAKOĞLU İ.; DU˘NDAR, S.; ŞAHIN, K., O˘ZERCAN, I. H. Effects of diode laser application on inflammation and mpo in periodontal tissues in a rat model. **J Appl Oral Sci**. Baurú. v. 26. p.1-13. Feb. 2018.
- VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - rationale for the design of new therapeutics. **Adv Drug Deliv Ver**. Cidade, v.57, n.7, p.959-971. May, 2005.
- VAL, D. R. **Eficácia e segurança de *Tephrosia toxicaria* Pers. na artrite da articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos**: Envolvimento do Óxido Nítrico, Hemeoxigenase-1 e Canais de potássio ATP-dependentes. 2012. 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2012.
- VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Cytokine- induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. **Journal of Bone and Mineral Research**. Foresterhill, v. 12, n. 11, p.1797-1804, Dec. 1997.

- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: Revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, Julho- agosto, 2001.
- VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, South Africa, v. 2013, n. 2013, p. 1-14. Feb. 2013. VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**. Lyon, France, v. 17, n.3, p. 319-336, February, 2006.
- VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; RONDON, F.C.M.; WILSON, M. E.; VIEIRA, I.G.P.; ANDRADE, H.F. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome1. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, p.1164-1168, 2012.
- WANG, G.; HAMID, T.; KEITH, R. J.; ZHOU, G.; PARTRIDGE, C. R.; XIANG, X.; KINGERY, J. R.; LEWIS, R. K.; LI, Q.; ROKOSH D. G.; FORD, R.; SPINALE, F. G.; RIGGS, D. W.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A.; BOLLI, R.; PRABHU, S. D. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. **Circulation**, Louisville, v. 121, n. 17, p. 1912-1925, Apr. 2010.
- WATANABE, K.; IIZUKA, T.; ADELEKE, A.; PHAM, L.; SHLIMON, A.E.; YASIN, M.; HORVATH, P.; UNTERMAN, T. G. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. **Journal of Periodontal Research**. Chicago, USA, v. 46, n. 1, p. 21-30, Feb, 2011.
- WAZA, A.A.; HAMID, Z.; ALI, S.; BHAT, S.A.; BHAT, M.A. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. **Inflammation Research**, India, v. 67, n. 7, p. 579-588, Jul. 2018.
- WINK, M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. **Annual Plant Reviews**, Heidelberg, v. 40, p. 1-19, Apr. 2018.
- WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Curr Med Chem**. Fujihan. v. 16, n. 32. p. 4236-4260. 2009.
- YANG, H.; BIAN, S.; CHEN, H.; WANG, L.; ZHAO, L.; ZHANG, X. ZHAO, Y.; ZENG, X.; ZHANG, F. Clinical characteristics and risk factors for overlapping rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. **Scientific Reports**, Dongcheng, China, v. 8, n. 1, p. 6180, April, 2018.
- YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Tochigi, Japan, v. 95, n. 7, p. 3597-3602, March, 1998.
- YET, S. F.; TIAN, R.; LAYNE, M. D.; WANG, Z. Y.; MAEMURA, K.; SOLOVYEVA, M.; ITH, B.; MELO, L. G.; ZHANG, L.; ING WALL, J. S.; DZAU, V. J.; LEE, M-E.; PERRELLA, M. A. Cardiac- specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. **Circulation Research**, v. 89, n. 2, p. 168-173, Jul. 2001.

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

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert reviews in molecular medicine**, Huddinge, Sweden, v. 15, p. e7, August, 2013.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International nesthesiology clinics**, [s.l.], Cincinnati, OH, v. 45, n. 2, p. 27-37, Apr, 2007.

ZHAO, L.; HUANG, L.; ZHANG, X. Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists. **Science China Life Sciences**, Beijing, China, v. 59, n. 12, p. 1241-1258, Sep. 2016.

ZHENG, L.; ZHAO, T.; SUN L. Research progress of the pharmacological action and pharmacokinetics of coumarins. **Shizen Guoyi Guoyao**, Shenyang, v. 24, n. 3, p. 714-7. 2013.

ANEXO A- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO “EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO DO CERNE DE *Platymiscium floribundum* VOG 6,7-DIMETOXICUMARINA E O DERIVADO SEMISSINTÉTICO 6,7 DIMETOXI-3-NITROCUMARINA EM UM MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS” PELA CEUA



Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurício Rocha Pentez, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8009

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Efeito do composto isolado do cerne de *Platymiscium floribundum* VOG,6,7- dimetoxicumarina e o derivado semissintético 6,7-dimetox-3-nitrocumarina em um modelo de periodontite experimental em ratas**, registrada com o nº **02/19**, sob a responsabilidade do **Profa. Dra. Heliada Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 11/06/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2018 até 01/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	Ratos: 158
Peso/Idade	Ratos: 200g/2-3 meses
Sexo	♀ Fêmeas
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 11 de junho de 2019.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA