



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

BIANCA DUTRA AGUIAR

**APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM
MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS**

**SOBRAL - CEARÁ
2022**

BIANCA DUTRA AGUIAR

**APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM
MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Iracema Matos de Melo

SOBRAL- CE

2022

BIANCA DUTRA AGUIAR

**APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM
MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Iracema Matos de Melo

Orientadora

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner

Examinadora

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Jordânia Marques de Oliveira Freire

Examinadora

Universidade Federal do Ceará (UFC)

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)

A227a Aguiar, Bianca Dutra.

Apigenina reduz reabsorção óssea inflamatória em camundongos submetidos à periodontite / Bianca Dutra Aguiar. – 2022.

59 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo .

1. Inflamação. 2. Reabsorção óssea. 3. Periodontite. 4. Apigenina. I. Título.

CDD 610

A Deus, por me guiar e dar forças
para seguir e à minha família, sem a
qual não seria possível a realização
desse sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Iracema Matos de Melo, pela sua fonte inesgotável de paciência, pelos ensinamentos, por confiar a mim esse projeto, pela compreensão com as minhas ausências, limitações e com os prazos extrapolados, pela fala doce e acolhedora e por ser o exemplo de professora que desejo ser. Deus sabia que eu precisava de você como orientadora.

À Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, que juntamente à minha orientadora, conduziu os momentos ricos de discussão no grupo de Estudos em Periodontia, fundamentais para nosso crescimento científico.

À Dra. Jordânia Freire, por todo auxílio em diversos momentos da execução da pesquisa, pela prontidão nas inúmeras dúvidas sanadas, por repassar todo seu conhecimento científico de forma leve e acessível.

Ao querido Dr. Anderson Weiny, pela incansável trabalho e orientação na confecção das lâminas histológicas, pela escuta das minhas angústias e por todo entusiasmo e esperança que tudo daria certo.

À técnica de laboratório de Farmacologia, Dra. Nayara Alves por toda eficiência, disposição e prontidão em ajudar durante os experimentos e sanar todas as minhas dúvidas.

À veterinária do biotério, Alana Godinho, pelo acolhimento e orientações, pelo cuidado e vigilância com os animais de nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jackson Costa, por toda disponibilidade na execução das análises, paciência nos ensinamentos e positividade com nossos resultados.

As amigas e companheiras de mestrado, Iara Lais e Luana Portela, pela partilha científica e pessoal em todas as etapas desse longo processo.

A todos da equipe do Laboratório de Farmacologia – LaFS, que tornaram a execução desse estudo possível.

Aos alunos de iniciação científica pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

Aos meus pais, Jorge Célio Aguiar e Renata Siqueira Dutra, por serem meus admiradores e apoiadores em todos os projetos profissionais. Por acreditarem que eu chegaria a esse momento, desde a seleção até a defesa, quando muitas vezes eu mesma não pude crer que conseguiria. Por todo apoio e incentivo durante essa trajetória e por todas as orações. Por todos os não dados aos seus próprios projetos, para dizerem sim aos meus. Uma vida inteira de agradecimentos a vocês dois, é pouco. Espero ser motivo de orgulho para vocês.

Ao meu irmão, Bruno Dutra, pelo companheirismo e por me ensinar através do exemplo que o único caminho possível, é buscar ser feliz fazendo o que gostamos.

Ao meu noivo, Gustavo Madeira, pelas palavras de motivação, pelo carinho e cuidado dispensados a mim, pela paciência e auxílio, principalmente, nos momentos finais e tão angustiantes desse processo.

A todos os meus amigos, pela compreensão com as minhas ausências e pelo auxílio emocional tão importante e indispensável a quem passa por essa jornada desafiadora.

E, por fim, ao meu avô, Meton Dutra Cordeiro (*in memoriam*), por ter me ensinado em vida a força que tem a fé, através da qual percorremos as mais difíceis trajetórias, pelo exemplo de honestidade, paciência, educação, resiliência e compreensão com todos que atravessam nosso caminho.

" Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime, pois o
Senhor, o seu Deus, estará com você
por onde você andar" Josué 1:9

RESUMO

O processo inflamatório está relacionado ao aumento da reabsorção em algumas doenças, como a periodontite, caracterizada por uma inflamação crônica em resposta a micro-organismos específicos que resulta em reabsorção óssea alveolar (ROA) e perda do dente. A apigenina (APG), um agente encontrado abundantemente na camomila, tem recebido maior atenção por seus efeitos anti-inflamatórios. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antirreabsortiva da APG na periodontite experimental em camundongos. Para isso, 48 camundongos *Swiss* machos foram utilizados em ensaios de periodontite induzida por ligadura, que consiste na inserção de um fio de algodão (4.0) ao redor dos primeiros molares inferiores. Os grupos experimentais consistiram em: Naïve, em que a periodontite não foi induzida, não tratado (NT) e APG, nos quais a periodontite foi induzida e receberam diariamente por gavagem 10 µl/kg de TW80 e APG 1, 3 ou 9 mg/kg, respectivamente. Após a eutanásia, suas mandíbulas foram removidas para análises da ROA e nível de inserção (NI). O tecido gengival também foi removido para quantificação de IL-1 β e IL-17, qRT-PCR para RANKL e OPG. Foram realizadas dosagens séricas de fosfatase alcalina total (FAT) e transaminases hepáticas, análises dos índices renal (IR) e hepático (IH) e da variação de massa corpórea. A ligadura promoveu significativa ROA, corroborado pelo aumento do nível de inserção (NI) na distal do 1º molar inferior e aumento da área de furca, bem como aumentou os níveis de IL-1 β e IL-17 e a expressão de RANKL no tecido gengival em camundongos NT em comparação ao Naïve. Em contrapartida, a administração de APG (9 mg/kg) promoveu redução da ROA, do NI e da área de furca do primeiro molar inferior, manteve os níveis de IL-1 β e IL-17 semelhantes aos do Naïve e aumentou a expressão de OPG. Sistemicamente, a APG não promoveu qualquer alteração significativa nos parâmetros avaliados. O APG apresentou um perfil protetor ósseo, provavelmente devido ao controle da progressão da doença através da modulação de citocinas osteoclastogênicas.

Palavras-chaves: Inflamação. Reabsorção óssea. Periodontite. Apigenina.

ABSTRACT

The inflammatory process is related to increased resorption in some diseases, such as periodontitis, characterized by chronic inflammation in response to specific microorganisms that results in alveolar bone resorption (ROA) and tooth loss. Apigenin (APG), an agent found abundantly in chamomile, has received increased attention for its anti-inflammatory effects. Thus, the objective was to evaluate the antiresorptive activity of APG in experimental periodontitis in mice. For this, 48 male Swiss mice were used in ligation-induced periodontitis trials, which consists of the insertion of a cotton thread (4.0) around the lower first molars. The experimental groups consisted of: Naïve, in which periodontitis was not induced, untreated (NT) and APG, in which periodontitis was induced and received daily by gavage 10 µl/kg of TW80 and APG 1, 3 or 9 mg/kg, respectively. After euthanasia, their mandibles were removed for analysis of ROA and attachment level (NI). Gingival tissue was also removed for quantification of IL-1 β and IL-17, qRT-PCR for RANKL and OPG. Serum measurements of total alkaline phosphatase (FAT) and hepatic transaminases, analysis of renal (RI) and hepatic (HI) indices and body mass variation were performed. The ligation promoted a significant ROA, corroborated by the increase in the attachment level (NI) in the distal of the 1st molar and increase in the furcation area, as well as increasing the levels of IL-1 β and IL-17 and the expression of RANKL in the gingival tissue. in NT mice compared to Naïve. On the other hand, the administration of APG (9 mg/kg) promoted a reduction in ROA, NI and the furcation area of the mandibular first molar, maintained the levels of IL-1 β and IL-17 similar to those of Naïve and increased the expression of OPG Systemically, APG did not promote any significant change in the parameters evaluated. APG presented a bone protective profile, probably due to the control of disease progression through the modulation of osteoclastogenic cytokines, in addition to being systemically safe.

Keywords: Inflammation. Bone resorption. Periodontitis. Apigenin.

LISTA DE SILGAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanino aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora-1
APG	Apigenina
AST	Aspartato aminotransferase
cFMS	Receptor do Fator estimulador de Colônia de Macrófagos
FAT	Fosfatase Alcalina Total
HMSCs	Células-tronco mesenquimais humanas
IL-17	Interleucina 17
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
MC3T3-E1	Linhagem celular precursora de osteoblastos
M-CSF	Fator estimulador de Colônia de Macrófagos
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1
NF-κB	Fator nucleoide kappa B
NI	Nível de Inserção
NO	Óxido Nitrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
ROA	Reabsorção Óssea Alveolar
TLR4	Receptor toll like 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Reabsorção Óssea Inflamatória	15
2.2 Periodontite	18
2.3 Apigenina	21
3 JUSTIFICATIVA	23
4 HIPÓTESE	23
5 OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo Geral	24
5.2 Objetivos Específicos	24
6 CAPÍTULO I	25
6.1 Artigo: APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS	26
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

O processo de remodelação óssea consiste na reabsorção e deposição de osso e pode ser controlado através de uma grande variedade de mecanismos inflamatórios e imunológicos (ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016). Diversas moléculas relacionadas ao sistema imunológico são consideradas cruciais nesse processo de remodelação óssea, e ilustram a interação entre sistema imunológico e o osso. Desta forma, as interleucinas 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6) e 17 (IL-17) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são consideradas importantes estimuladores da osteoclastogênese, o que favorece a reabsorção óssea. Sabe-se que estas citocinas estão envolvidas e promovem a expressão de fatores chave relacionados com a diferenciação dos osteoclastos, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), conduzindo a lesões ósseas patológicas para a reabsorção (STEEVE et al., 2004; ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016; ZUPAN; JERAS; MARC, 2013).

De fato, a literatura tem relatado a modulação dos processos imunoinflamatórios com o objetivo de reduzir a destruição do tecido ósseo, como ocorre em doenças inflamatórias reabsortivas (GUIMARÃES *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2022), como é o caso da periodontite. A periodontite é uma doença cuja resposta inflamatória é decorrente de microrganismos específicos presentes no periodonto e resulta em destruição do osso alveolar, do ligamento periodontal e do cemento radicular (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; PAGE; KORNMAN, 1997; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013).

Nesse contexto, a indústria farmacêutica e pesquisadores, têm dedicado esforços a descobrirem novos produtos naturais e seus derivados, que representem novas abordagens na modulação dos processos inflamatórios com o mínimo de danos gastrointestinais, cardiovasculares, hepáticos e renais, objetivando a redução da reabsorção óssea inflamatória (GOŚCINIAK *et al.*, 2021; TAALAB *et al.*, 2021). Especificamente sobre a periodontite, embora a terapia padrão com controle mecânico seja indispensável para a obtenção de sucesso no tratamento dessa doença, são necessárias pesquisas que descrevam sobre a atuação de novos compostos eficazes na terapia periodontal adjuvante na

modulação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas nessa patologia (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

Os flavonoides, constituem a maior classe de nutrientes não essenciais em nossa dieta, são compostos dietéticos que podem oferecer benefícios à saúde, a baixo custo e com mínimos efeitos adversos. Estudos têm demonstrado que esses compostos apresentam, inclusive, atividades anticancerígenas e anti-inflamatórias (CARDENAS *et al.*, 2016; GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009).

Um importante flavonoide é a apigenina (APG), encontrada abundantemente na salsa e no aipo, e que tem se destacado devido aos seus diversos efeitos biológicos, os quais incluem efeitos ansiolíticos, sedativos (HOSTETLER; RALSTON; SCHWARTZ, 2017), antivirais, antibacterianos, antioxidantes, antiapoptóticos e anticâncer (SALEHI *et al.*, 2019). Ela tem recebido destaque por parte dos pesquisadores devido relato de seus efeitos anti-inflamatórios (MARQUEZ-FLORES *et al.*, 2016) e mecanismos imunorregulatórios (CARDENAS *et al.*, 2016). Muitos efeitos da APG têm sido relatados em pesquisas, porém os mecanismos e seus efeitos anti-inflamatórios ainda não foram completamente elucidados, principalmente em relação a patologias ósseas, e mais estudos necessitam ser realizados. Dessa forma, o presente estudo visa investigar os efeitos da APG em um modelo de periodontite experimental em camundongos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reabsorção Óssea Inflamatória

O tecido ósseo é uma entidade dinâmica, que vive em constante processo de remodelação, que é regulada através da atividade celular em resposta a fatores sistêmicos, locais e estresse mecânico. A homeostasia desse tecido compreende o equilíbrio entre os processos de deposição e reabsorção óssea, e o desequilíbrio desse sistema pode acarretar doenças que interferem na densidade e arquitetura óssea, como doenças reabsortivas ou com formações ósseas aumentadas (CHEN *et al.*, 2012; ERIKSEN, 2010; ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016). As células ósseas também exercem papel importante no metabolismo deste tecido, nesse caso, os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, caracterizadas pela capacidade de reabsorver matriz óssea e os osteoblastos, que são células responsáveis pela deposição de cálcio e pela formação de novo tecido ósseo (CHEN *et al.*, 2018). Os osteócitos, são células que derivam de osteoblastos maduros que, durante processo de formação óssea, assumem uma morfologia diferenciada e ficam aprisionados na matriz, e são capazes de secretar substâncias necessárias à homeostasia óssea (BONEWALD, 2011; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; UDA *et al.*, 2017).

Diante disso, considerando os fatores locais, existem uma grande variedade de mecanismos inflamatórios e imunológicos que participam do processo de remodelação óssea (EBERSOLE *et al.*, 2013). Assim, a descoberta do eixo do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK)/seu ligante (RANKL)/osteoprotegerina (OPG) foi de fundamental importância para o entendimento de como a comunicação entre o sistema imune e esquelético medeiam os processos de remodelação óssea (RAUNER *et al.*, 2013; ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016).

A ligação de RANK-RANKL é geralmente aceita como a principal via responsável pela ativação da osteoclastogênese e destruição óssea mediada pela inflamação (ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016), pois essa ligação promove a diferenciação, maturação e a ativação das células osteoclásticas. O RANK, expresso na superfície de pré-osteoclastos, é ativado quando se liga ao RANKL,

presente na superfície de osteoblastos e osteócitos, e é suprimido quando se liga à OPG (BADO *et al.*, 2017). A OPG compete com o RANK pela ligação ao RANKL, consistindo em um importante fator antiosteoclastogênico. A OPG ainda é capaz de bloquear a transdução do sinal a jusante do RANK e inibir o desenvolvimento e a ativação dos osteoclastos (KHOSLA, 2001; NAKASHIMA *et al.*, 2000; PACIFICI, 2011).

A diferenciação das células osteoclásticas também é regulada pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que agindo sobre seu receptor (cFMS), é essencial para proliferação, sobrevivência e fusão de células mononucleadas precursoras de osteoclastos, assim como pelo aumento da sobrevivência de osteoclastos maduros (PACIFICI, 2011; TAKAYANAGI, 2007; XIONG *et al.*, 2015).

A ligação do RANKL ao seu receptor, RANK, resulta também na ativação do fator de transcrição conhecido por fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1), tanto pela via fator nuclear kappa B (NFκB)/ proteína ativadora-1 (AP-1) / gene de ativação imediata (c-fos), como pela sinalização de cálcio. Esse fator de transcrição (NFATc1), por sua vez, é responsável pela indução de genes osteoclásticos específicos necessários para ativação de osteoclastos (TAKAYANAGI *et al.*, 2002; WHYTE, 2006).

A literatura tem mostrado que o RANKL e o M-CSF são essenciais para a renovação osteoclástica fisiológica, enquanto citocinas adicionais são responsáveis pela supra-regulação de osteoclastos. A relação intrínseca entre o sistema imune, resposta inflamatória e remodelação óssea fica evidente através dos relatos na literatura sobre o envolvimento de diversas células do tecido ósseo, citocinas e receptores nesse processo reabsortivo (BRAUN; SCHETT, 2012; PACIFICI, 2011).

Nesse contexto, o eixo RANK/RANKL/OPG sofre interferências de diversos mediadores, sendo a reabsorção óssea facilitada na presença de mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas-1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-11, IL-17 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), uma vez que estes aumentam a expressão de RANKL e diminuem a expressão de OPG (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; NAKASHIMA *et al.*, 2000; NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014; REN *et al.*, 2021; SON *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2019).

A IL-17 pode mediar a secreção de fatores inflamatórios como IL-1, TNF- α e IL-6, favorecendo ainda mais a reabsorção óssea e inibindo a formação óssea (SONG *et al.*, 2019; TSO *et al.*, 2010), bem como, por agir sinergicamente aumentando a expressão de RANK em precursores de osteoclastos (ADAMOPOULOS *et al.*, 2010) e de RANKL em osteoblastos (ADAMOPOULOS; BOWMAN, 2008; DEMIER *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2019). Ademais, outros mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, trombina, calicreína e quimiocinas também aumentam a expressão de RANKL, na superfície de osteoblastos, fibroblastos e linfócitos (ZUPAN; JERAS; MARC, 2013). 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 M-CSF, como tem sido descrito para o TNF- α (ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016).

Para uma melhor compreensão sobre o tecido ósseo e os processos de reabsorção e formação óssea, em condições normosistêmicas ou patológicas, são utilizados modelos experimentais, sobretudo visando o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas. Por se caracterizar como um modelo que resulta em reabsorção óssea alveolar significativa, a periodontite induzida em roedores tem sido amplamente utilizada em pesquisas como modelo experimental da reabsorção óssea inflamatória, particularmente quando o objetivo é avaliar condições cuja reabsorção é decorrente da instalação de um processo inflamatório (BEZERRA *et al.*, 2000; DE LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004).

2.2 Periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória, altamente prevalente (KASSEBAUM *et al.*, 2017) em humanos, que ocorre na presença de uma microbiota patogênica e tem por consequência a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, como osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular, podendo ocasionar a perda dentária (GRAVES; LI; COCHRAN, 2011; HAJISHENGALLIS, 2015; PAPAPANOU *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da doença inicia através da resposta ao desafio microbiano, em que acontece a disbiose da microbiota subgengival, ou seja, onde antes habitavam em sua maioria bactérias simbióticas, ocorre uma mudança gradual em sua composição, dando lugar a bactérias patogênicas em maior número. Após essa mudança, as bactérias migram pelo epitélio gengival e invadem o tecido conjuntivo (GRAVES; LI; COCHRAN, 2011; HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2016). O lipopolissacarídeo (LPS) de membrana estimula a liberação de aminas vasoativas e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pré-formado, seguida pelo recrutamento de outras células residentes no tecido gengival que liberam mediadores inflamatórios, aumentando a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão (GONZÁLEZ-OSUNA *et al.*, 2022).

Posteriormente, células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos são recrutadas, sobretudo os neutrófilos, que representam a primeira linha de defesa contra os patógenos periodontais e também participam no processo de destruição do periodonto (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011), uma vez que liberam uma variedade de fatores, como espécies reativas de oxigênio, collagenases, outras proteases e, inclusive, TNF- α (KINANE *et al.*, 2011; NATHAN, 2006; PRESHAW; TAYLOR, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Esse processo inflamatório resulta na destruição dos tecidos periodontais, que favorece a invasão dos tecidos por maior quantidade de células, a saber, macrófagos e linfócitos (KINANE *et al.*, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). De fato, o infiltrado neutrofílico diminui com a progressão da doença, havendo predominância de linfócitos na periodontite (KINANE *et al.*, 2011).

Além do TNF- α , outras citocinas e mediadores inflamatórios participam do processo de destruição tecidual do periodonto, como as interleucinas, IL-1 β , IL-6,

IL-17, prostaglandina E₂, metaloproteinases de matriz (MMP) e óxido nítrico (KINANE *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2008; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). De fato, as citocinas pró-inflamatórias possuem papel fundamental na patogênese da periodontite (DARVEAU, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2019), principalmente as interleucinas e TNF- α , que apresentam níveis aumentados na doença. Elas favorecem a reabsorção óssea por estimularem a osteoclastogênese através da diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, pelo aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANKL) e do seu receptor (RANK), pela redução da expressão de osteoprotegerina (OPG), bem como pelo aumento da interação do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) com o seu receptor (cFMS) (YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013).

Diante disso, os modelos animais são estratégias de estudo valiosas e nesse caso, a periodontite induzida por ligadura em roedores é um modelo experimental bem estabelecido (BEZERRA *et al.*, 2000; DE LIMA *et al.*, 2000). Sua vantagem é poder avaliar de forma mais complexa as alterações clínicas e histopatológicas apresentadas durante a periodontite, por se tratar de um modelo com características semelhantes aos humanos, como a estrutura e a organização dos tecidos periodontais (BEZERRA *et al.*, 2000; HAJISHENGALLIS, 2015; LEITÃO *et al.*, 2004; STRUILLLOU *et al.*, 2010).

Nesse contexto, estudos pré-clínicos têm demonstrado os efeitos do aumento da expressão do RANKL em modelos de periodontite (GUIMARÃES *et al.*, 2016; TENG, 2002; TENG *et al.*, 2000), assim como, têm relatado sobre o aumento na expressão de RANKL na presença do patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* (REDDI; BROWN; BELIBASAKIS, 2011). Além disso, clinicamente, há relatos de que os níveis de RANKL são mais elevados em pacientes com periodontite (CROTTI *et al.*, 2003; GABR *et al.*, 2017; KAWAI *et al.*, 2006; LÓPEZ ROLDÁN; GARCÍA GIMÉNEZ; ALPISTE ILLUECA, 2020; TEODORESCU *et al.*, 2019; WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007), associado à redução dos níveis de OPG (CROTTI *et al.*, 2003; GABR *et al.*, 2017; TEODORESCU *et al.*, 2019).

Entendendo a patogênese da periodontite, compreende-se que a remoção mecânica regular da placa bacteriana é considerada o principal meio para prevenir e impedir a progressão da periodontite. Estudos longitudinais

mostram o sucesso da terapia padrão: raspagem e alisamento radicular, higiene oral diária do paciente e visitas de manutenção regular ao dentista para remoção de novos depósitos subgengivais (LINDHE; KARRING, 2005). Embora a terapia mecânica possa ser clinicamente efetiva na grande maioria dos pacientes, mesmo que os patógenos não sejam completamente eliminados, a persistência ou recidiva de crescimento de certos microrganismos em locais tratados deve ser considerada a principal causa de resultados insatisfatórios no tratamento dessa doença (LINDHE; KARRING, 2005).

Em alguns casos, na presença de bolsas profundas $\geq 5\text{mm}$ e/ou lesões de furca, a eficácia da terapia padrão pode ser limitada devido ao difícil acesso para uma correta instrumentação. Estudos pioneiros demonstraram que alguns casos de periodontite não respondem satisfatoriamente à terapia convencional de raspagem e alisamento radicular havendo recidiva e/ou progressão de perda de inserção (JEPSEN; JEPSEN, 2016; SAUER *et al.*, 2010). Quando os efeitos esperados não são alcançados, terapias adjuntas podem ser utilizadas visando melhores resultados no tratamento da doença (RAMOS *et al.*, 2022), como é o caso da utilização de produtos naturais. Estudos tem demonstrado o efeito benéfico da utilização desses produtos de forma adjuvante à terapia periodontal padrão com raspagem e alisamento radicular no controle do biofilme e dos parâmetros da doença (AGUIAR, 2020; BATISTA; DE VASCONCELOS CATÃO, 2019; BRAZ; DOS SANTOS FAGUNDES; ESPÍNDOLA, 2021).

Portanto, estudos pré-clínicos têm sido realizados a fim de descobrir novos alvos farmacológicos sistêmicos que funcionem de forma adjuvante à terapia padrão para a obtenção de sucesso no tratamento destas doenças periodontais (FREIRE *et al.*, 2019). De fato, estudos em modelos experimentais de periodontite em animais descobriram que a manipulação da expressão de citocinas e seus receptores afeta o fenótipo de perda óssea alveolar na periodontite (ESKAN *et al.*, 2012).

2.3 APIGENINA

A apigenina (4', 5,7-trihidroxiflavona) é um flavonóide natural, que recebe esta nomenclatura pois vem do gênero *Apium*, da família Apiceae (SUNG; CHUNG; KIM, 2016). É amplamente encontrada em plantas e vegetais como por exemplo no aipo (*Apium graeolens*) e na salsa (*Petroselinum crispum*) (MADUNIĆ *et al.*, 2018) e em ervas como a camomila (*Matricaria recutita*) (SALEHI *et al.*, 2019). Devido à sua baixa toxicidade, fácil disponibilidade e efeitos notáveis nas células normais quando comparadas às células cancerígenas, a APG vem ganhando interesse dos pesquisadores como um composto benéfico e promotor da saúde (MADUNIĆ *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2017).

Diante disso, a abordagem terapêutica de flavonoides, como a APG, tem recebido destaque em pesquisas clínicas principalmente devido os seus efeitos anti-inflamatório (CICEK *et al.*, 2021; KERDAR *et al.*, 2019), antioxidantes (FIDELIS *et al.*, 2019), antidepressivo (AL-YAMANI *et al.*, 2022; BIJANI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2019), hepatoprotetor (CHEN; YANG; GROSSER, 2013), anticâncer (PENG *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2021), antiapoptótico (ZHOU *et al.*, 2018), antisenescência (SANG *et al.*, 2017) e efeitos estrogênicos (LECOMTE *et al.*, 2019), bem como o estudo de seus mecanismos imunoregulatórios (CARDENAS *et al.*, 2016) e atuação no processo inflamatório (MARQUEZ-FLORES *et al.*, 2016). Na literatura existem poucos relatos acerca da toxicidade ou de reações adversas causadas pelo uso da APG *in vivo* quando consumidas em doses relevantes para as terapêuticas abordadas (CARDENAS *et al.*, 2016; MARQUEZ-FLORES *et al.*, 2016; SARKAR *et al.*, 2022).

Em relação aos efeitos anti-inflamatórios da APG, estudos *in vitro*, demonstram que a APG é capaz de inibir moléculas de adesão induzidas por citocinas (GERRITSEN *et al.*, 1995), inibir a capacidade de células dendríticas derivadas da medula óssea estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) de produzir citocinas osteoclastogênicas, incluindo TNF - α e IL - 1 β (LI *et al.*, 2015), além de inibir a produção de óxido nítrico (NO), IL- 6 (CHOI, 2007; GERRITSEN *et al.*, 1995) e IL-8, induzidos por TNF- α (GERRITSEN *et al.*, 1995).

Bandyopadhyay *et al.* (2006), através de estudo *in vitro*, demonstraram que a APG pode afetar todos os estágios da osteoclastogênese, desde a inibição

da diferenciação dos osteoclastos até a sua sobrevivência e reabsorção óssea (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006). Outros estudos *in vitro*, relatam que a APG aumenta significativamente o crescimento de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, causam uma elevação significativa do conteúdo de colágeno nas células osteoblásticas (CHOI, 2007), bem como da atividade da fosfatase alcalina (CHOI, 2007; ZHANG *et al.*, 2015) e a mineralização em células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) (ZHANG *et al.*, 2015). Recentemente, um estudo realizado com cultivo de células da linha de osteoblastos MG63 demonstrou que o uso de APG apresentou capacidade de reduzir a expressão de RANKL e aumentar a expressão de OPG (MELGUIZO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Considerando estudos em animais, a administração de APG reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em ratos (DANG *et al.*, 2018; SAHU *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019), assim como relatado nos estudos *in vitro*. Estudos relatam que o tratamento com APG também é capaz de modular IL-17, regular negativamente a expressão de NF- κ B (DANG *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2019), reduzir o estresse oxidativo, regular a via de sinalização de receptor toll like-4 (TLR4) / NF- κ B, e inibir a apoptose dos neurônios mediada por mitocôndrias em ratos (ZHAO *et al.*, 2019). Em relação aos efeitos da APG no osso, estudo realizado com ratas ovariectomizadas demonstrou um efeito positivo na renovação óssea, aumentando o conteúdo mineral e a densidade do osso trabecular no colo do fêmur desses animais, demonstrando efeito promissor do uso de APG no tratamento da osteoporose (PARK *et al.*, 2008).

Assim, através da avaliação dos efeitos da APG em células ósseas, a literatura tem relatado efeitos benéficos desse composto no osso, tanto em pesquisas *in vivo* como *in vitro*. Os achados da literatura indicam que em condições clínicas que envolvam a atuação de mediadores inflamatórios, como na reabsorção óssea inflamatória, a APG pode desempenhar um papel benéfico justificando sua avaliação no modelo de periodontite em animais.

3 JUSTIFICATIVA

A periodontite ainda é uma das principais causas de perda de dentes em adultos e fator de risco para outras doenças sistêmicas (SANZ; VAN WINKELHOFF; PERIODONTOLOGY, 2011) e a terapêutica mecânica, considerada padrão ouro para tratamento da doença, apresenta algumas limitações, como, áreas de difícil acesso para raspagem, interferindo no índice de sucesso do tratamento (JEPSEN; JEPSEN, 2016).

Diante disso, pesquisadores têm desempenhado esforços em descobrir novas abordagens adjuvantes à terapia padrão para obtenção de melhores resultados no tratamento da periodontite (RAMOS *et al.*, 2022) e a identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fármacos fitoterápicos tem ganhado destaque devido seus efeitos anti-inflamatórios já relatados (BATISTA; DE VASCONCELOS CATÃO, 2019; BRAZ; DOS SANTOS FAGUNDES; ESPÍNDOLA, 2021), e nesse caso, a APG tem recebido destaque em pesquisas principalmente devido os seus efeitos anti-inflamatórios (CICEK *et al.*, 2021; KERDAR *et al.*, 2019).

Portanto, o estudo da possível eficácia e segurança da administração da apigenina em um modelo de periodontite em camundongos poderá contribuir para a identificação de uma abordagem terapêutica adjuvante no manejo dessa doença.

4 HIPÓTESE

A modulação da resposta inflamatória através da administração da Apigenina diminui a reabsorção óssea alveolar em camundongos submetidos a periodontite.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antirreabsortiva da Apigenina (APG) na periodontite experimental em camundongos.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antirreabsortiva da APG
 - Através de análises macroscópica e histológica do periodonto de camundongos submetidos à periodontite.
 - Através da quantificação da expressão de RANKL, OPG e TRAP no tecido gengival de camundongos submetidos à periodontite.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da APG
 - Através da quantificação dos níveis de gengivais de IL-1 β e IL-17 em camundongos submetidos à periodontite.
- Avaliar o efeito sistêmico da APG
 - Através de análises séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina total (FAT),
 - Através da avaliação dos índices hepático e renal.
 - Através da variação de massa corpórea.

6 CAPÍTULO I

**APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM MODELO
DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS**

6.1 ARTIGO

APIGENINA REDUZ A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA EM MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS

Bianca Dutra Aguiar¹, Iracema Matos de Melo²

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ceará, 62010-820, Brasil.

2 Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, Ceará, 62010-820, Brasil.

RESUMO

Introdução: A apigenina (APG), um agente encontrado abundantemente na camomila, tem recebido maior atenção por seus efeitos anti-inflamatórios.

Objetivo: Avaliar a atividade antirreabsortiva da APG na periodontite experimental em camundongos. **Metodologia:** 48 camundongos *Swiss* machos foram utilizados em ensaios de periodontite induzida pela inserção de um fio de algodão (4.0) ao redor dos primeiros molares inferiores. Os grupos experimentais consistiram em: Naïve, em que a periodontite não foi induzida, não tratado (NT) e APG, nos quais a periodontite foi induzida e receberam diariamente por gavagem

10 µl/kg de TW80 e APG 1, 3 ou 9 mg/kg, respectivamente. Após a eutanásia, suas mandíbulas foram removidas para análises da ROA e nível de inserção (NI). O tecido gengival também foi removido para quantificação de IL-1β e IL-17, qRT-PCR para RANKL e OPG. Foram realizadas dosagens séricas de fosfatase alcalina total e transaminases hepáticas, análises dos índices renal e hepático e da variação de massa corpórea. **Resultados:** A ligadura promoveu significativa ROA, corroborado pelo aumento do nível NI na distal do 1º molar inferior e aumento da área de furca, bem como aumentou os níveis de IL-1β e IL-17 e a expressão de RANKL no tecido gengival em camundongos NT em comparação ao Naïve. Em contrapartida, a administração de APG (9 mg/kg) promoveu redução da ROA, do NI e da área de furca do primeiro molar inferior, manteve os níveis de IL-1β e IL-17 semelhantes aos do Naïve e aumentou a expressão de OPG. Sistemicamente, a APG não promoveu qualquer alteração significativa nos parâmetros avaliados. **Conclusão:** A APG apresentou um perfil protetor ósseo,

provavelmente devido ao controle da progressão da doença através da modulação de citocinas osteoclastogênicas, além de ser segura sistemicamente.

Palavras-chaves: Inflamação. Reabsorção óssea. Periodontite. Apigenina.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos países em desenvolvimento, cerca de 65 a 80% da população usa produtos naturais na atenção primária à saúde devido à sua disponibilidade, custo acessível e facilidade de manuseio [1]. A apigenina (4', 5,7-trihidroxiflavona) é um flavonoide natural, que recebe esta nomenclatura pois vem do gênero *Apium*, da família Apiceae [2]. É amplamente encontrada no aipo (*Apium graeolens*), na salsa (*Petroselinum crispum*) [3] e na camomila (*Matricaria recutita*) [4]. Devido à sua baixa toxicidade, fácil disponibilidade, efeitos anti-inflamatórios e mecanismos imunorregulatórios [5,6], a APG vem ganhando interesse dos pesquisadores como um composto benéfico e promotor da saúde [3,7].

Especificamente sobre esse efeito anti-inflamatório, estudos *in vitro* e *in vivo* relatam o papel inibitório da APG na produção de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico (NO) [6,8], interleucina (IL)-6 [9], IL-8 [10], IL-1 β [11] e o fator de necrose tumoral (TNF)- α [12–15], na modulação de IL-17 e regulação negativa da expressão do fator nuclear (NF)- κ B [12,16]. Além disso, estudos *in vitro* descrevem o papel inibitório da APG na produção de citocinas osteoclastogênicas, incluindo TNF - α e IL - 1 β [17]. Portanto, a literatura tem relatado efeitos benéficos desse composto no osso, tanto em pesquisas *in vivo* como *in vitro*, o que justifica a investigação de seus efeitos em doenças reabsortivas ósseas, como é o caso da periodontite.

. A periodontite é definida, 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, como “uma doença inflamatória multifatorial crônica, associada com biofilmes de placa disbiótica e caracterizada por progressiva destruição do aparelho de suporte dentário” [18].

Altamente prevalente em humanos, a periodontite pode ocasionar a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, como osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular, podendo levar à perda dentária [18–21].

Por se tratar de uma doença inflamatória, diversos mediadores inflamatórios participam do processo de destruição tecidual do periodonto, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, prostaglandina E₂, metaloproteinases de matriz (MMP) e NO [22–24], possuindo papel fundamental na patogênese da periodontite [25,26]. De fato, os níveis aumentados de interleucinas e TNF- α , observados na doença, favorecem a reabsorção óssea por estimularem a osteoclastogênese através da diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, pelo aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANKL) e do seu receptor (RANK), e pela redução da expressão de osteoprotegerina (OPG) [24].

Dada a notável capacidade da APG em modular diferentes mediadores da inflamação, incluindo citocinas osteoclastogênicas, o presente estudo propôs investigar a eficácia deste composto em uma condição inflamatória reabsortiva particular, a periodontite. Além disso, considerando que em alguns casos o tratamento periodontal convencional pode ter resultados limitados [27], sendo necessária, por vezes, terapia adjuvante [28], bem como que o tratamento da periodontite é um campo relativamente desconhecido para medicamentos fitoterápicos como adjuvante terapêutico, objetivou-se avaliar os efeitos da APG em um modelo de periodontite em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Apigenina

A apigenina (APG), 4',5,7-Trihidroxiflavona, 5,7-Dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4-benzopirona, apresentada como um sólido amarelo cristalino, foi adquirida junto à Sigma-Aldrich, com massa molar de 270,24 g/mol, número CAS 520-36-5, código do produto 10798 e com pureza acima de 95% (HPLC). Para a diluição da APG e grupo controle (NT) foi utilizada solução salina de NaCl 0,9% com 4% de polissorbato 80 (Tween 80®; TW80).

Reagentes

Para coloração das lâminas histológicas, foi obtida a coloração de Hematoxilina de Harris da empresa Larboclin (Pinhais, Paraná, Brasil) e Eosina da empresa Êxodo Científica (Hortolândia, São Paulo, Brasil). Para ELISA de IL-1 β e IL-17 foram utilizados os kits de citocinas e reagentes obtidos da empresa R&D Systems® (Minneapolis, Minnesota, EUA). Para qRT-PCR de RANKL e OPG, foram obtidos Syber Green, Superscript, Primers e Trizol da empresa Thermo Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts, EUA). Para realização das dosagens bioquímicas de fosfatase alcalina total (FAT), aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT) foram adquiridos os reagentes da empresa LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 48 camundongos *Swiss* machos, com massa corpórea entre 20 e 30 gramas. Os animais receberam ração comercial balanceada adequada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claros/escuros de 12 h e temperatura de 22 °C durante todo o experimento. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Ceará campus Sobral sob número de protocolo 05/19.

Os grupos experimentais consistiram em três: Naive, Não tratado (NT) e Apigenina (APG). O grupo Naive, composto por 6 camundongos, não foi submetido à periodontite e não recebeu nenhum tipo de veículo. O grupo NT,

composto por 6 camundongos, os quais foram submetidos à periodontite induzida por ligadura e receberam veículo composto de solução salina NaCl 0,9% com 4% de polissorbato 80 (TW80), por gavagem, diariamente, a partir do dia de colocação da ligadura até o momento da eutanásia. E o grupo APG, foi subdividido em 3 grupos, com 6 camundongos cada, os quais foram submetidos à periodontite induzida por ligadura e receberam APG nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg [29], por gavagem, diariamente, a partir do dia de colocação da ligadura até o momento da eutanásia. O protocolo experimental foi repetido nos grupos Naive, NT e APG 9 mg/kg para obtenção de tecido gengival para realização de qrtPCR para RANKL e OPG e dosagens bioquímicas de FAT, AST e ALT.

Modelo de Periodontite induzida por ligadura

A periodontite foi induzida pela inserção bilateral de um fio de sutura de algodão 4.0 (Point Suture, Fortaleza) em torno dos primeiros molares inferiores, especificamente na região cervical desses dentes, de camundongos sob anestesia com a combinação de xilazina e quetamina (90 e 10 mg/kg, , respectivamente). Para inserção do fio, foram utilizados espaçadores digitais endodônticos C, a fim de criar um espaço entre o primeiro e o segundo molar, e a ligadura foi posicionada cuidadosamente no sulco gengival e o nó posicionado mesialmente. Os animais foram eutanasiados após 14 dias da indução da periodontite [30,31].

Análise macroscópica e histométrica do osso alveolar

Para análise macroscópica, após a eutanásia dos animais, suas mandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas. A hemiarcada direita foi dissecada e corada com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade [32,33]. Para a quantificação da reabsorção óssea, as peças foram fotografadas e as imagens foram, então, avaliadas junto ao programa de computador Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA), considerando demarcação desde a junção cimento-esmalte (JCE) até a crista

óssea alveolar. Essa distância foi considerada como a reabsorção óssea alveolar (ROA) nos animais em que a periodontite foi induzida. Essa área foi comparada à outra previamente conhecida ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) [34].

Para a análise histométrica, as mandíbulas esquerdas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e desmineralizadas em EDTA 10%, por aproximadamente 30 dias. As peças foram, então, incluídas em parafina para realização de cortes seriados de $4 \mu\text{m}$ em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina. Posteriormente, imagens foram obtidas dessa região em microscópio ($\times 100$) e lançadas em um programa de computador Image J (ImageJ 48x, National Institute of Health; EUA). Para quantificação do nível de inserção, a face distal do primeiro molar foi usada para medir a distância linear da JCE até o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal [35,36]. Na região de furca do primeiro molar foi considerada a área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca, distância considerada como ROA nos animais em que a periodontite foi induzida [37].

ELISA para TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17

Para o ELISA, foram coletados tecidos gengivais das hemiarçadas direitas e esquerda dos animais no momento da eutanásia. Os níveis gengivais de IL-1 β e IL-17 foram dosados nas referidas amostras. Para isso, os tecidos coletados foram homogeneizados e processados como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995) [38]. A detecção das proteínas IL-1 β e IL-17 foi determinada por ELISA, como descrito previamente [39]. O resultado foi expresso em pg/ml.

Reação de amplificação em tempo real (qRT-PCR) para RANKL e OPG

Para qRT-PCR, foram coletados tecidos gengivais das hemiarçadas direitas e esquerda dos animais no momento da eutanásia. O total de RNA foi extraído das amostras de tecido gengival usando TRIzol. A transcrição reversa foi realizada com o software SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) usando SYBR Green Master Mix, conforme indicado pelo fabricante. Os pares de primers usados

neste estudo foram: RANKL (TGAGCTATGGAAGGGGGTCA/GTCCCAGCGCAATGTAACAA) e OPG (GAGACGCACCTAGCACTGAC/AAGGGTTTCCTGGGTTGTCC).

Análise sistêmica

No momento da eutanásia, foram coletadas 0,5 ml de sangue do plexo orbital de camundongos. A dosagem da fosfatase alcalina total (FAT), aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT) foram realizadas conforme metodologia descrita pelo fabricante (LABTEST®). O rim e o fígado dos animais também foram avaliados, por meio dos índices, calculados através da razão do peso úmido do rim esquerdo e fígado pelo peso do animal no dia da eutanásia. Por fim, todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante os dias seguintes do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

Análise estatística

Os resultados paramétricos, de acordo com a normalidade, foram expressos como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos foram utilizados: One Way Anova seguido pelo teste de Bonferroni, teste t de Student não pareado ou Two Way Anova seguido pelo teste de Tukey, conforme a necessidade. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Será utilizado o programa de estatística GraphPad Prism® versão 5.0 (La Jolla-CA, EUA).

RESULTADOS

Efeito da APG na reabsorção óssea alveolar

A figura 1 ilustra que a colocação da ligadura no primeiro molar inferior promoveu um aumento ($p < 0,05$) da região entre JCE-COA, indicando importante reabsorção óssea alveolar (ROA) nos camundongos que receberam somente veículo (Figura 1B e F) em comparação àqueles em que a periodontite não foi

induzida (Figura 1A e F). Embora a menor dose de APG (Figura 1C) não tenha prevenido essa ROA, os animais tratados com APG nas doses de 3 (Figura 1D) e 9 (Figura 1E) mg/kg apresentaram significativa redução da ROA quando comparado com o grupo NT (Figura 1F), demonstrando efeito protetor ósseo.

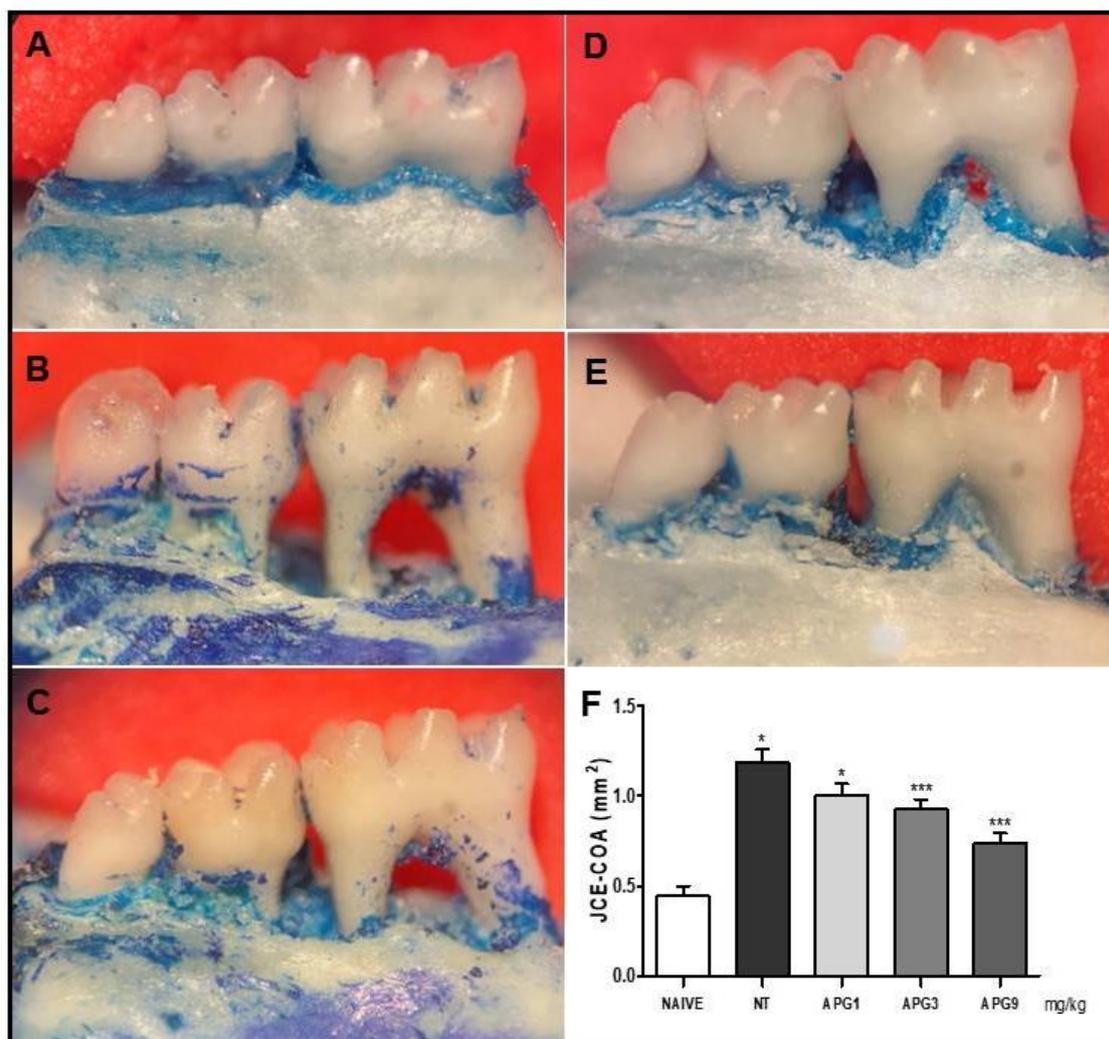


Figura 1: Efeito do tratamento com *apigenina* (APG) na reabsorção óssea alveolar em camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg ou de veículo (NT) nos animais. Os dados representam a média \pm EPM da reabsorção óssea alveolar no 14º dia de experimento, de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao NAIVE; *** $p < 0,05$ em relação ao NAIVE e NT (Anova, teste de Bonferroni).

Microscopicamente, o grupo NT apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no nível de inserção na distal do 1º molar inferior (Figura 2B e D), bem como aumento da área de furca (Figura 2E), ambos em relação ao periodonto de animais do grupo Naïve (Figura 2A). A administração de APG 9 mg/kg diminuiu

significativamente ($p < 0,05$) o nível de inserção e a área de furca do primeiro molar inferior (Figura 2C, D e E)

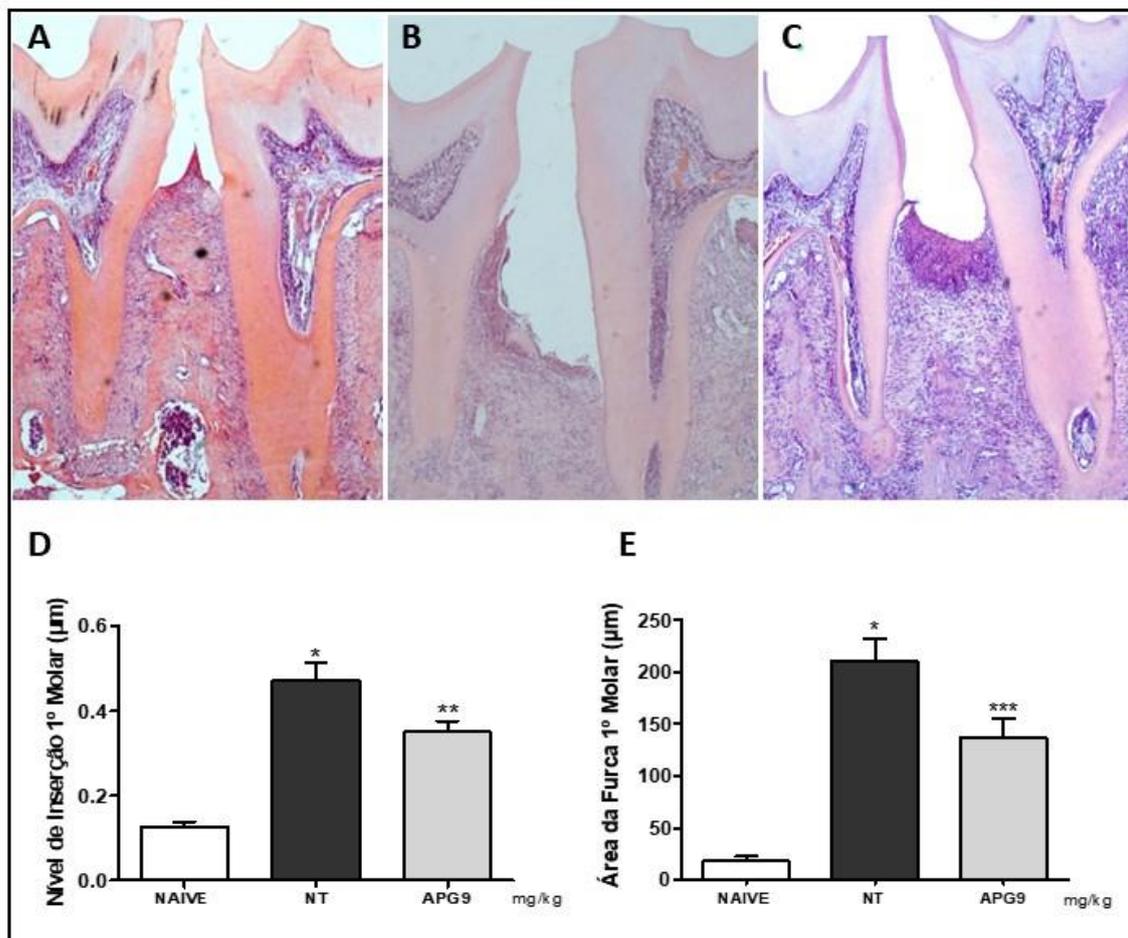


Figura 2: Efeito do tratamento com *apigenina* (APG) na análise histométrica do osso alveolar em camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG 9 mg/kg ou de veículo (NT) nos animais. Os dados representam a média \pm EPM do nível de inserção na distal do 1º molar inferior (A) e da área de furca do 1º molar inferior (B), ambos no 14º dia de experimento, de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao NAIVE; ** $p < 0,05$ em relação aoa NT; *** $p < 0,05$ em relação ao NAIVE e NT (Anova, teste de Bonferroni).

Efeito da APG nos níveis gengivais de IL-1 β e IL-17

Os níveis de IL-1 β e IL-17 no tecido gengival dos animais NT apresentaram aumento significativo quando comparados com aqueles encontrados no tecido gengival de animais Naïve ($p < 0,05$) (Figura 3A e B). Por sua vez, embora o tratamento com APG na dose de 9 mg/kg não tenha reduzido os níveis gengivais

de IL-1 β e IL-17 quando comparados aos do grupo NT, manteve os níveis dessas citocinas semelhantes ao de animais em que a periodontite não foi induzida (Naïve) (Figura 3A e B).

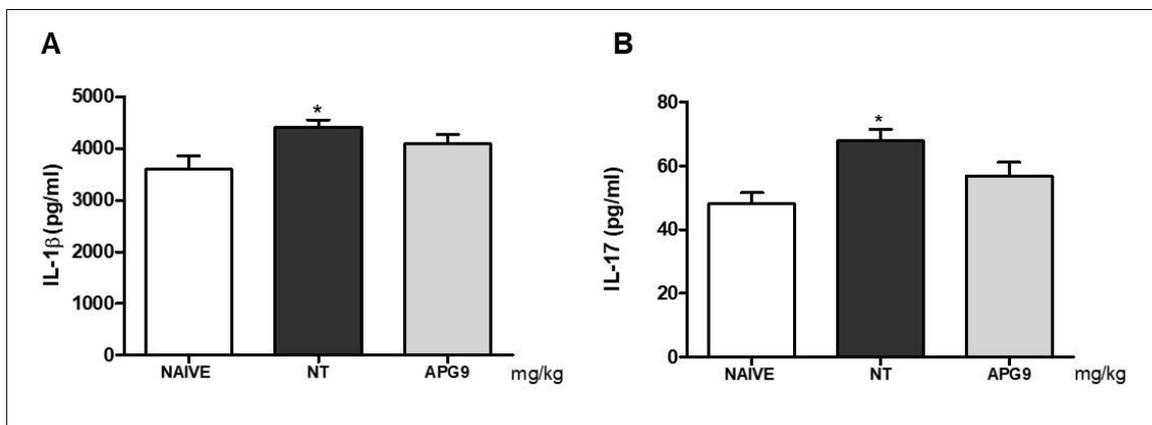


Figura 3: Efeitos da APG nos níveis de IL-1 β (A) e IL-17 (B) no tecido gengival de camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG na dose de 9 mg/kg ou de veículo (NT) nos animais. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis de IL-1 β (A) e IL-17 (B) no tecido gengival de animais, no 14^o dia de experimento, de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao NAIVE (ANOVA, Teste de Bonferroni).

Efeito da APG na expressão gênica de RANKL e OPG

A expressão gênica de RANKL no tecido gengival dos animais NT aumentou significativamente quando comparados com àquela observada no tecido gengival de animais Naïve ($p < 0,05$) (Figura 4A), enquanto, a administração de APG 9 mg/kg diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a expressão de RANKL ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo NT (Figura 4A).

Em relação à expressão gênica de OPG, embora não tenha sido observada diferença significativa quando comparados os grupos NT e Naïve (Figura 4B), a administração de APG 9 mg/kg promoveu aumento significativo na expressão gênica de OPG ($p < 0,05$) quando comparado aos animais do grupo NT e Naïve (Figura 4B).

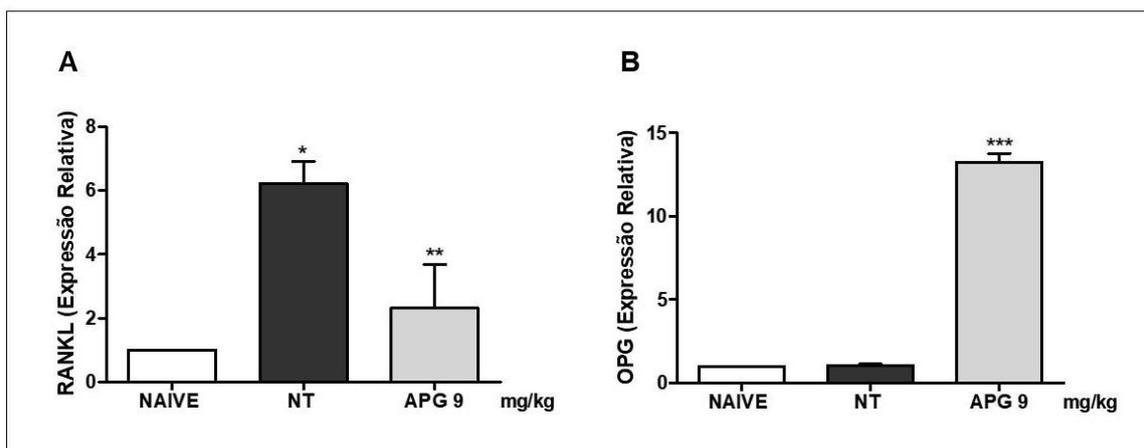


Figura 4: Efeitos da APG na expressão gênica do tecido gengival de camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG na dose de 9 mg/kg ou de veículo (NT) nos animais. Os dados representam a média \pm EPM da expressão gênica de RANKL (A) e OPG (B) no tecido gengival de animais, no 14º dia de experimento, de 6 animais por grupo * $p < 0,05$ em relação ao NAÍVE; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,05$ em relação ao NAÍVE e NT (Anova, teste de Bonferroni).

Efeitos sistêmicos da APG

Sistemicamente, não foram observadas diferenças significantes nos índices hepáticos e renais dos animais do grupo NT em relação ao grupo Naíve, o que foi corroborado pela ausência de alterações nos níveis séricos da FAT e das transaminases hepáticas (Tabela 1). O tratamento com APG 9 mg/kg também não promoveu quaisquer alterações nos índices hepático, renal ou nas dosagens bioquímicas das enzimas hepáticas (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do tratamento com apigenina (APG) nos índices hepático e renal e níveis séricos de fosfatase alcalina total e transaminases hepáticas de camundongos submetidos à periodontite.

Análise/Grupos	Naíve	NT	APG 9mg/kg
	PERIODONTITE		
Índice Hepático (g)	0,048 \pm 19.10 ⁻⁴	0,051 \pm 10.10 ⁻⁴	0,050 \pm 13.10 ⁻⁴
Índice Renal (g)	0,0081 \pm 2.10 ⁻⁴	0,0086 \pm 3.10 ⁻⁴	0,0083 \pm 2.10 ⁻⁴
FAT (U/l)	108,5 \pm 19,27	82,23 \pm 20,64	92,30 \pm 19,49
AST (U/l)	97,17 \pm 18,39	123,9 \pm 28,49	151,0 \pm 31,26
ALT (U/l)	79,58 \pm 17,72	141,8 \pm 42,79	94,25 \pm 25,95

A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG na dose de 9 mg/kg ou de veículo (TW80) nos animais. Os dados representam a média \pm EPM dos índices hepático e renal e níveis séricos de fosfatase alcalina total, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no 14º dia de experimento (Anova, teste de Bonferroni).

Ao longo de todo o período experimental, os animais tiveram suas massas corpóreas avaliadas. Observou-se que animais Naïve apresentaram aumento progressivo de massa corpórea até o 14º dia, enquanto os animais submetidos à periodontite apresentaram uma perda inicial de peso, seguida por um ganho progressivo, sem, no entanto, acompanhar a curva dos animais Naïve ($p > 0,05$). Por fim, não houve alteração de massa corpórea dos animais tratados com APG em relação aos animais NT.

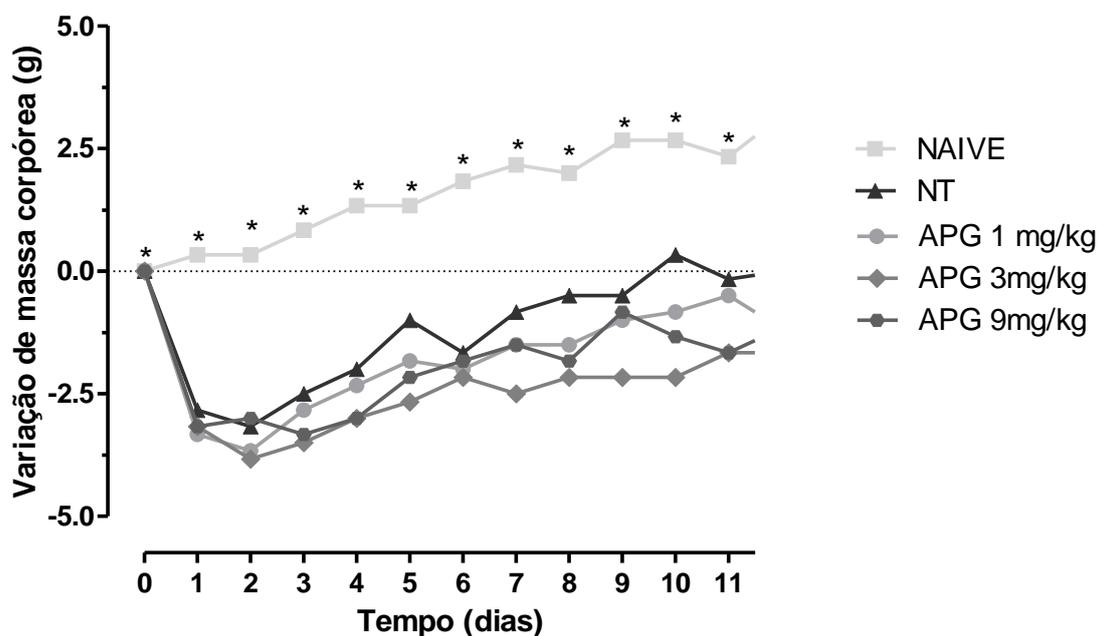


Gráfico 5: Efeito do tratamento com apigenina (APG) na variação de massa corpórea de camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura no primeiro molar inferior. 30 min antes da indução da periodontite e diariamente até o momento da eutanásia, foi feita administração por gavagem de APG nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg ou de veículo (NT) nos animais. Os animais tiveram suas massas corpóreas aferidas, diariamente, até o dia 14, quando foram eutanasiados. Os dados representam a média \pm EPM da variação de massa corpórea em relação à massa inicial, de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação a NT (Two-Way ANOVA).

DISCUSSÃO

A fitoterapia, caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, faz parte da cultura popular há milhares de anos. O interesse pelo estudo das plantas medicinais, seus componentes, mecanismos de ação e toxicidade têm crescido consideravelmente [40]. Entre 1981 e 2019, foram aprovados 1.881 novos medicamentos, dos quais aproximadamente 41,2% foram obtidos de fontes naturais [40], pois, os produtos naturais exercem um papel relevante na cura e tratamento de diversas doenças [41–43].

A literatura tem demonstrado que certos agentes farmacológicos fitoterápicos demonstram evidência promissora de efetividade no tratamento de doenças ósseas, como osteoartrose [44], osteoporose [45,46] e como adjuvante na periodontite [37,47,48]. Nesse contexto, no presente estudo, a administração do flavonoide APG mostrou-se promissora em um modelo de reabsorção óssea inflamatória, a periodontite, uma vez que reduziu a reabsorção óssea alveolar (ROA) e o nível de inserção, bem como, manteve os níveis gengivais de IL-1 β e IL-17 semelhantes aos observados no periodonto de animais em que a doença não foi induzida, associada à diminuição da expressão gênica de RANKL e ao aumento da expressão de OPG.

A APG é um flavonoide natural, que devido à sua baixa toxicidade, fácil disponibilidade [3,7], e efeitos anti-inflamatórios [49,50], vem ganhando interesse dos pesquisadores como um composto promotor de saúde [3,7], o que justifica o estudo de seus efeitos em condições ósseas inflamatórias, como a periodontite. Para isso, foi utilizado um modelo de reabsorção óssea alveolar por ligadura, que mimetiza as principais características da periodontite em humanos. A escolha desse modelo de estudo partiu de relatos da literatura que demonstram sucesso na indução de intensa ROA na instalação de ligadura no primeiro molar inferior de camundongos pelo período de 14 dias [30,31]. O que foi confirmado pelos nossos resultados, uma vez que após 14 dias de permanência do fio de algodão no primeiro molar inferior de camundongos, foi observado no grupo que recebeu apenas veículo (NT) um aumento significativo da região compreendida entre

junção cimento-esmalte e a crista óssea, bem como da área de furca, indicando importante ROA nesses animais.

A reabsorção óssea observada na periodontite está relacionada ao processo inflamatório subjacente à doença [26], tal como ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e a IL-17 [23,24]. No nosso estudo foi constatada a participação dessas citocinas no processo de destruição periodontal, visto que os animais com periodontite (NT) apresentaram elevação dos níveis gengivais de IL-1 β e IL-17 em associação ao aumento da ROA e do nível de inserção. Por sua vez, a administração da APG 9 mg/kg manteve os níveis gengivais dessas citocinas semelhantes aos níveis dos animais em que a periodontite não foi induzida, indicando uma tendência da APG em impedir o aumento do processo inflamatório na periodontite. Relatos prévios da literatura também demonstram o efeito da APG na redução do nível de IL-1 β em ratos com hemorragia subaracnóidea [51], em macrófagos murinos induzidos por lipopolissacarídeo de membrana [52] e em inflamação na pele de ratos [53]. Ainda de acordo com nossos resultados, estudos mostram a regulação negativa da IL-17 em modelo de asma murina [54,55].

Essas citocinas favorecem o processo de ROA, seja pelo recrutamento de outras citocinas pró-inflamatórias [56], seja pelo aumento da expressão de RANKL e RANK [24] e redução da expressão de OPG [24,57], o que favorece a osteoclastogênese [58,59]. A participação do eixo RANK/RANKL/OPG na periodontite tem sido descrita e envolve o aumento de RANKL e RANK e a diminuição de OPG [37,60,61] o que favorece a interação entre o RANKL e seu receptor RANK, com consequente ativação dos osteoclastos e aumento da reabsorção [62]. No presente estudo, foi observado aumento da expressão gênica de RANKL nos animais NT, enquanto o tratamento com APG 9 mg/kg reduziu a expressão de RANKL e aumentou a expressão de OPG, o que pode ser decorrente de seus efeitos nos níveis de IL-1 β e IL-17, além de justificar o efeito protetor ósseo observado pela APG. Tais achados estão de acordo com estudos que descrevem os mesmos efeitos da APG em outras patologias ósseas, como a osteoporose, em que a APG atua como modulador do eixo RANK/RANKL/OPG [45,63], no entanto, não existem relatos de estudos que investiguem a atuação da APG na ROA observada na periodontite.

Por fim, a análise da variação de massa corpórea demonstrou que os animais submetidos à periodontite apresentaram perda de peso, esse fato se deve à realização do procedimento de indução da periodontite experimental, por conta da anestesia e da instalação do processo inflamatório local, o que gera dificuldade desses animais em se alimentarem nos primeiros dias após a indução. Ademais, a APG demonstrou ser um composto seguro sistemicamente, quando utilizada em modelo de periodontite experimental, por não interferir no ganho de massa corpórea dos animais e não ocasionar lesões hepáticas e renais, assim como a literatura tem descrito sobre sua baixa toxicidade [3,7].

CONCLUSÃO

A APG apresentou um perfil protetor ósseo, reduzindo a reabsorção óssea alveolar, provavelmente devido ao controle da progressão da doença através da modulação de citocinas osteoclastogênicas, além de ser segura sistemicamente.

REFERÊNCIAS

- [1] Nogueira AO, Oliveira YIS, Adjafre BL, de Moraes MEA, Aragao GF. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum*: a literature review. *Fundam Clin Pharmacol* 2019;33:4–12.
- [2] Sung B, Chung HY, Kim ND. Role of apigenin in cancer prevention via the induction of apoptosis and autophagy. *J Cancer Prev* 2016;21:216.
- [3] Madunić J, Madunić IV, Gajski G, Popić J, Garaj-Vrhovac V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Lett* 2018;413:11–22.
- [4] Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The therapeutic potential of apigenin. *Int J Mol Sci* 2019;20:1305.
- [5] Marquez-Flores YK, Villegas I, Cárdeno A, Rosillo MÁ, Alarcon-de-la-Lastra C. Apigenin supplementation protects the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by inhibiting canonical and non-canonical inflammasome signaling pathways. *J Nutr Biochem* 2016;30:143–52.
- [6] Cardenas H, Arango D, Nicholas C, Duarte S, Nuovo GJ, He W, et al. Dietary apigenin exerts immune-regulatory activity in vivo by reducing NF- κ B activity, halting leukocyte infiltration and restoring normal metabolic function. *Int J Mol Sci* 2016;17:323.
- [7] Tang D, Chen K, Huang L, Li J. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2017;13:323–30.

- [8] Duarte S, Arango D, Parihar A, Hamel P, Yasmeen R, Doseff AI. Apigenin protects endothelial cells from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by decreasing caspase-3 activation and modulating mitochondrial function. *Int J Mol Sci* 2013;14:17664–79.
- [9] Zhang X, Zhou C, Zha X, Xu Z, Li L, Liu Y, et al. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell Biochem* 2015;407:41–50.
- [10] Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen C-P, Phan SA, Ligon GF, et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 1995;147:278.
- [11] Mohammad F E, Hasan WA, Mohamed EG. Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;31:e21896.
- [12] Dang Y, Li Z, Wei Q, Zhang R, Xue H, Zhang Y. Protective effect of apigenin on acrylonitrile-induced inflammation and apoptosis in testicular cells via the NF- κ B pathway in rats. *Inflammation* 2018;41:1448–59.
- [13] Zhao F, Dang Y, Zhang R, Jing G, Liang W, Li Z. Apigenin attenuates acrylonitrile-induced neuro-inflammation in rats: involved of inactivation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2019;75:105697.
- [14] Sahu R, Dua TK, Das S, De Feo V, Dewanjee S. Wheat phenolics suppress doxorubicin-induced cardiotoxicity via inhibition of oxidative stress, MAP kinase activation, NF- κ B pathway, PI3K/Akt/mTOR impairment, and cardiac apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2019;125:503–19.
- [15] Zhang T, Su J, Guo B, Wang K, Li X, Liang G. Apigenin protects blood-brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Int Immunopharmacol* 2015;28:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.024>.
- [16] Pang G-M, Li F-X, Yan Y, Zhang Y, Kong L-L, Zhu P, et al. Herbal medicine in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2019;132:78–85.
- [17] Li J, Zeng L, Xie J, Yue Z, Deng H, Ma X, et al. Inhibition of Osteoclastogenesis and Bone Resorption in vitro and in vivo by a prenylflavonoid xanthohumol from hops. *Sci Rep* 2015;5:1–14.
- [18] Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 2018;89:S173–82.
- [19] Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011;90:143–53.
- [20] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:30–44.
- [21] Wu Y, Dong G, Xiao W, Xiao E, Miao F, Syverson A, et al. Effect of aging on periodontal inflammation, microbial colonization, and disease susceptibility. *J Dent Res* 2016;95:460–6.
- [22] Lima V, Bezerra MM, Leitão RF de C, Brito GA de C, Rocha FAC da, Ribeiro R de A. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite: papel de moduladores farmacológicos.

- Periodontia 2008;7–19.
- [23] Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG, order) WG 2 of the SEW on P (in alphabetical. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions–Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011;38:44–8.
- [24] Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med* 2013;15.
- [25] Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:481–90.
- [26] Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity* 2019;50:778–95.
- [27] Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol 2000* 2016;71:82–112.
- [28] Uslu MÖ, Eltas A, Marakoğlu İ, Dündar S, Şahin K, Özercan İH. Effects of diode laser application on inflammation and mpo in periodontal tissues in a rat model. *J Appl Oral Sci* 2018;26.
- [29] Hassan SM, Khalaf MM, Sadek SA, Abo-Youssef AM. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Pharm Biol* 2017;55:766–74.
- [30] Oliveira SHP, Brito VGB, Frasnelli SCT, Ribeiro B da S, Ferreira MN, Queiroz DP, et al. Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease. *Front Pharmacol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00708>.
- [31] Pereira SSC, Araujo GF, de Queiroz LN, Câmara PR, Pascoal VDB, Azevedo RS, et al. An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. *MethodsX* 2019;6:2156–65.
- [32] De Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Daniel Portela Vidal F, Da Rocha FAC, de Castro Brito GA, et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000;108:123–9.
- [33] Lima V, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol* 2004;75:162–8.
- [34] Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2004;39:101–6.
- [35] Sima C, Aboodi GM, Lakschevitz FS, Sun C, Goldberg MB, Glogauer M. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 down-regulation in oral neutrophils is associated with periodontal oxidative damage and severe chronic periodontitis. *Am J Pathol* 2016;186:1417–26.
- [36] Lima V, Melo IM, Taira TM, Buitrago LYW, Fonteles CSR, Leal LKAM, et al. *Uncaria tomentosa* reduces osteoclastic bone loss in vivo. *Phytomedicine* 2020;79:153327.
- [37] Guimarães MV, Melo IM, Adriano Araújo VM, Tenazoa Wong DV, Roriz Fonteles CS, Moreira Leal LKA, et al. Dry extract of *Matricaria recutita*

- L.(Chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *J Periodontol* 2016;87:706–15.
- [38] Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1995;115:1265–75.
- [39] Cunha FQ, Boukili MA, da Motta JIB, Vargaftig BB, Ferreira SH. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *Eur J Pharmacol* 1993;238:47–52.
- [40] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 2020;83:770–803.
- [41] Fiut MA, Deutsch G, Arruda L, Marques D, Leda PH, Botsaris A, et al. A prática clínica em fitoterapia magistral: uma experiência interprofissional da Associação Brasileira de Fitoterapia. *VITTALLE-Revista Ciências Da Saúde* 2018;30:152–8.
- [42] Santana MDO, de Sá JS, Neves AF, Figueredo PGJ, Viana JA. O Poder das Plantas Medicinais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de Idosas. *Multidebates* 2018;2:10–27.
- [43] de Freitas Cavalcanti JT, da Silva Candido TR, da Silva TFMG, Lins UMDBL. A UTILIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA FITOTERAPIA COMO POLÍTICA PÚBLICA DE SAÚDE. *Rev Multidiscip Em Saúde* 2021;2:17.
- [44] Cró GCF. Fitoterapia como terapêutica coadjuvante e preventiva da osteoartrose 2017.
- [45] Park JA, Ha SK, Kang TH, Oh MS, Cho MH, Lee SY, et al. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life Sci* 2008;82:1217–23.
- [46] Marques MAA, Lima DA, Andreotti CE, Junior AG, Lourenço ELB. Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no Brasil. *Arq Ciências Da Saúde Da UNIPAR* 2016;20.
- [47] Rayyan M, Terkawi T, Abdo H, Abdel Azim D, Khalaf A, AlKhouli Z, et al. Efficacy of grape seed extract gel in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical study. *J Investig Clin Dent* 2018;9:e12318.
- [48] Freire JMO, Chaves H V., Teixeira AH, de Sousa LHT, Pinto IR, Costa JJ do N, et al. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. In tree extract on periodontitis inflammation in rats. *PLoS One* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223800>.
- [49] Cicek M, Unsal V, Doganer A, Demir M. Investigation of oxidant/antioxidant and anti-inflammatory effects of apigenin on apoptosis in sepsis-induced rat lung. *J Biochem Mol Toxicol* 2021;35:e22743.
- [50] Kerdar T, Rabienejad N, Alikhani Y, Moradkhani S, Dastan D. Clinical, in vitro and phytochemical, studies of *Scrophularia striata* mouthwash on chronic periodontitis disease. *J Ethnopharmacol* 2019;239:111872.
- [51] Choy KW, Murugan D, Leong X-F, Abas R, Alias A, Mustafa MR. Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NF κ B) signaling in cardiovascular diseases: a mini review. *Front Pharmacol* 2019:1295.

- [52] Park C-H, Min S-Y, Yu H-W, Kim K, Kim S, Lee H-J, et al. Effects of apigenin on RBL-2H3, RAW264. 7, and HaCaT cells: anti-allergic, anti-inflammatory, and skin-protective activities. *Int J Mol Sci* 2020;21:4620.
- [53] Ma X, Lin Y, Liu Y, Li W, He J, Fang M, et al. Effects of apigenin treatment on random skin flap survival in rats. *Front Pharmacol* 2021;12:7.
- [54] Pang L, Zou S, Shi Y, Mao Q, Chen Y. Apigenin attenuates PM2. 5-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by down-regulating NF- κ B in murine model of asthma. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12:3700.
- [55] Li J, Zhang B. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of Th17 cells. *Fitoterapia* 2013;91:298–304.
- [56] González-Osuna L, Sierra-Cristancho A, Cafferata EA, Melgar-Rodríguez S, Rojas C, Carvajal P, et al. Senescent CD4⁺ CD28⁻ T Lymphocytes as a Potential Driver of Th17/Treg Imbalance and Alveolar Bone Resorption during Periodontitis. *Int J Mol Sci* 2022;23:2543.
- [57] Teodorescu AC, Martu I, Teslaru S, Kappenberg-Nitescu DC, Goriuc A, Luchian I, et al. Assessment of salivary levels of RANKL and OPG in aggressive versus chronic periodontitis. *J Immunol Res* 2019;2019.
- [58] Zhao L, Huang L, Zhang X. Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists. *Sci China Life Sci* 2016;59:1241–58.
- [59] Bado I, Gugala Z, Fuqua SAW, Zhang XHF. Estrogen receptors in breast and bone: From virtue of remodeling to vileness of metastasis. *Oncogene* 2017;36:4527–37.
- [60] Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong Y-Y, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59–67.
- [61] Teng Y-TA. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun* 2002;70:5269–73.
- [62] Cochran DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol* 2008;79:1569–76. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080233>.
- [63] Melguizo-Rodríguez L, Manzano-Moreno FJ, Illescas-Montes R, Ramos-Torrecillas J, de Luna-Bertos E, Ruiz C, et al. Bone protective effect of extra-virgin olive oil phenolic compounds by modulating osteoblast gene expression. *Nutrients* 2019;11:1722.
- [64] Begum N, Rajendra Prasad N, Kanimozhi G, Agilan B. Apigenin prevents gamma radiation-induced gastrointestinal damages by modulating inflammatory and apoptotic signalling mediators. *Nat Prod Res* 2022;36:1631–5.
- [65] Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RFS, Almeida-Amaral EE. Oral efficacy of apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004442.

7 CONCLUSÃO

A APG reduziu a reabsorção óssea alveolar em camundongos, portanto representa uma ferramenta biotecnológica promissora como opção terapêutica segura em estudos pré-clínicos de periodontite experimental em camundongos e pode oferecer uma nova possibilidade de terapia periodontal adjuvante ao tratamento mecânico padrão da periodontite

REFERÊNCIAS

ADAMOPOULOS, I. E. et al. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF- κ B on osteoclast precursors. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2010.

ADAMOPOULOS, I. E.; BOWMAN, E. P. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 5, p. 1–9, 2008.

AGUIAR, G. A. Bioatividade antimicrobiana do extrato da punica granatum em bactérias da doença periodontal: revisão de literatura. 2020.

AL-YAMANI, M. J. et al. The role of serotonergic and catecholaminergic systems for possible antidepressant activity of apigenin. **Saudi journal of biological sciences**, v. 29, n. 1, p. 11–17, 2022.

BADO, I. et al. Estrogen receptors in breast and bone: From virtue of remodeling to vileness of metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 32, p. 4527–4537, 2017.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 184–197, 2006.

BATISTA, A. L. A.; DE VASCONCELOS CATÃO, M. H. C. O uso da Curcumina (Curcuma Longa) no tratamento periodontal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2019.

BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 6, p. 1009–1014, 2000.

BIJANI, S. et al. Neuroprotective Effect of Apigenin on Depressive-Like Behavior: Mechanistic Approach. **Neurochemical Research**, p. 1–12, 2021.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of bone and mineral research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BRAUN, T.; SCHETT, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. **Current osteoporosis reports**, v. 10, n. 2, p. 101–108, 2012.

BRAZ, A. J. S.; DOS SANTOS FAGUNDES, D.; ESPÍNDOLA, L. C. P. O uso da própolis como coadjuvante ao tratamento periodontal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e182101724341–e182101724341, 2021.

CARDENAS, H. et al. Dietary apigenin exerts immune-regulatory activity in vivo by reducing NF- κ B activity, halting leukocyte infiltration and restoring normal metabolic function. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 323, 2016.

CHEN, B. et al. Canonical Wnt signaling is required for Panax notoginseng saponin-mediated attenuation of the RANKL/OPG ratio in bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation. **Phytomedicine**, v. 19, n. 11, p. 1029–1034, 2012.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 104, p. 58–66, 2013.

CHEN, X. et al. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective tissue research**, v. 59, n. 2, p. 99–107, 2018.

CHOI, E. M. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor- α -induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Pharmazie**, v. 62, n. 3, p. 216–220, 2007.

CICEK, M. et al. Investigation of oxidant/antioxidant and anti-inflammatory effects of apigenin on apoptosis in sepsis-induced rat lung. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 5, p. e22743, 2021.

CROTTI, T. et al. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 4, p. 380–387, 2003.

DANG, Y. et al. Protective effect of apigenin on acrylonitrile-induced inflammation and apoptosis in testicular cells via the NF- κ B pathway in rats. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1448–1459, 2018.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 481–490, 2010.

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

DEMIER, N. C. A. et al. IL-17 e sua relação com as Lesões Perirradiculares: Revisão de Literatura. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 15, n. 2, 2021.

EBERSOLE, J. L. et al. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 163–202, 2013.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.

ESKAN, M. A. et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. **Nature immunology**, v. 13, n. 5, p. 465–473, 2012.

FIDELIS, Q. C. et al. Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill.: A source of bioactive compounds with multifunctional properties. **Natural product research**, v. 33, n. 10, p. 1500–1503, 2019.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed research international**, 2015.

FREIRE, J. M. O. et al. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. In tree extract on periodontitis inflammation in rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, 1 Nov. 2019.

GABR, A. M. et al. Evaluation of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin levels in saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Tanta Dental Journal**, v. 14, n. 2, p. 83, 2017.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, 2009.

GERRITSEN, M. E. et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 2, p. 278, 1995.

GONZÁLEZ-OSUNA, L. et al. Senescent CD4⁺ CD28⁻ T Lymphocytes as a Potential Driver of Th17/Treg Imbalance and Alveolar Bone Resorption during Periodontitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2543, 2022.

GOŚCINIAK, A. et al. Can Plant Materials Be Valuable in the Treatment of Periodontal Diseases? Practical Review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2185, 2021.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of dental research**, v. 90, n. 2, p. 143–153, 2011.

GUIMARÃES, M. V. et al. Dry extract of *Matricaria recutita* L.(Chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . **Journal of periodontology**, v. 87, n. 6, p. 706–715, 2016.

HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 2015.

HAIJSHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J. M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 116–151, 2017.

HAIJSHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Dancing with the stars: how choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 477–489, 2016.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **Journal of molecular medicine**, v. 79, n. 5, p. 243–253, 2001.

HOSTETLER, G. L.; RALSTON, R. A.; SCHWARTZ, S. J. Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 423–435, 2017.

JEPSEN, K.; JEPSEN, S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 71, n. 1, p. 82–112, 2016.

KASSEBAUM, N. J. 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. **Journal of dental research**, v. 96, n. 4, p. 380–387, 2017.

KAWAI, T. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **The American journal of pathology**, v. 169, n. 3, p. 987–998, 2006.

KERDAR, T. et al. Clinical, in vitro and phytochemical, studies of *Scrophularia striata* mouthwash on chronic periodontitis disease. **Journal of ethnopharmacology**, v. 239, ID: 111872, 2019.

KHOSLA, S. Minireview: The opg/rankl/rank system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050–5055, 2001.

KINANE, D. F. et al. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, p. 44–48, 2011.

LECOMTE, S. et al. Deciphering the molecular mechanisms sustaining the estrogenic activity of the two major dietary compounds zearalenone and apigenin in ER-positive breast cancer cell lines. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 237, 2019.

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

LI, J. et al. Inhibition of Osteoclastogenesis and Bone Resorption in vitro and in vivo by a prenylflavonoid xanthohumol from hops. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2015.

LIMA, V. et al. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 1, p. 162–168, 2004.

LIMA, V. et al. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite: papel de moduladores farmacológicos. **Periodontia**, p. 7–19, 2008.

LINDHE, J.; KARRING, T. E LANG, NP Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. **Rio de Janeiro/RJ: Editora Guanabara Koogan S**, 2005.

LÓPEZ ROLDÁN, A.; GARCÍA GIMÉNEZ, J. L.; ALPISTE ILLUECA, F. Impact of periodontal treatment on the RANKL/OPG ratio in crevicular fluid. **PLoS One**, v. 15, n. 1, e.0227757, 2020.

MADUNIĆ, J. et al. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11–22, 2018.

MANTOVANI, A. et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 778–795, 2019.

MARQUEZ-FLORES, Y. K. et al. Apigenin supplementation protects the development of dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by inhibiting canonical and non-canonical inflammasome signaling pathways. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 30, p. 143–152, 2016.

MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L. et al. Bone protective effect of extra-virgin olive oil phenolic compounds by modulating osteoblast gene expression. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1722, 2019.

NAKASHIMA, T. et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 3, p. 768–775, 2000.

NARDONE, V.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, v. 69, p. 438–446, 2014.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006.

NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? **Journal of clinical periodontology**, v. 38, p. 49–59, 2011.

PACIFICI, R. Osteoimmunology: Meeting Report from the 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. **IBMS BoneKEy**, v. 8, p. 123, 2011.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 9–11, 1997.

PANG, G.-M. et al. Herbal medicine in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. **Chinese medical journal**, v. 132, n. 01, p. 78–85, 2019.

PAPAPANOU, P. N. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, v. 89, p. S173–S182, 2018.

PARK, J. A. et al. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. **Life sciences**, v. 82, n. 25–26, p. 1217–1223, 2008.

PENG, Q. et al. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer. **Oncology letters**, v. 15, n. 2, p. 1379–1388, 2018.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **Journal of clinical periodontology**, v. 38, p. 60–84, 2011.

RAMOS, T. C. DE S. et al. Effect of systemic antibiotic and probiotic therapies as adjuvant treatments of subgingival instrumentation for periodontitis: a randomized controlled clinical study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 30, 2022.

RAUNER, M. et al. Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 160, n. 2, p. 114–125, 2013.

REDDI, D.; BROWN, S. J.; BELIBASAKIS, G. N. Porphyromonas gingivalis induces RANKL in bone marrow stromal cells: involvement of the p38 MAPK. **Microbial pathogenesis**, v. 51, n. 6, p. 415–420, 2011.

REN, Y. et al. Anti-Interleukin-6 Therapy Decreases Hip Synovitis and Bone Resorption and Increases Bone Formation Following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 36, n. 2, p. 357–368, 2021.

SAHU, R. et al. Wheat phenolics suppress doxorubicin-induced cardiotoxicity via inhibition of oxidative stress, MAP kinase activation, NF- κ B pathway, PI3K/Akt/mTOR impairment, and cardiac apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 503–519, 2019.

SALEHI, B. et al. The therapeutic potential of apigenin. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1305, 2019.

SANG, Y. et al. Apigenin exhibits protective effects in a mouse model of d-galactose-induced aging via activating the Nrf2 pathway. **Food & function**, v. 8, n. 6, p. 2331–2340, 2017.

SANZ, M.; VAN WINKELHOFF, A. J.; PERIODONTOLOGY, W. G. 1 OF THE S. E. W. ON. Periodontal infections: understanding the complexity–consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, p. 3–6, 2011.

SARKAR, C. et al. **Redox Activity of Flavonoids: Impact on Human Health, Therapeutics, and Chemical Safety** *Chemical Research in Toxicology* American Chemical Society, 21 Feb. 2022.

SAUER, P. M. et al. Eficácia da azitromicina no tratamento da periodontite agressiva. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 67, n. 1, p. 19, 2010.

SON, H. S. et al. Benzydamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1 β expression. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 3, p. 462–474, 2020.

SONG, L. et al. Interleukin-17A facilitates osteoclast differentiation and bone resorption via activation of autophagy in mouse bone marrow macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 6, p. 4743–4752, 2019.

STEEVE, K. T. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 1, p. 49–60, 2004.

STRUILLOU, X. et al. Experimental animal models in periodontology: a review. **The open dentistry journal**, v. 4, p. 37, 2010.

SUNG, B.; CHUNG, H. Y.; KIM, N. D. Role of apigenin in cancer prevention via the induction of apoptosis and autophagy. **Journal of cancer prevention**, v. 21, n. 4, p. 216, 2016.

TAALAB, M. R. et al. Intrapocket application of tea tree oil gel in the treatment of stage 2 periodontitis. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

TAKAYANAGI, H. et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Developmental cell**, v. 3, n. 6, p. 889–901, 2002.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 292–304, 2007.

TANG, D. et al. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 3, p. 323–330, 2017.

TENG, Y.-T. A. et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 6, p. R59–R67, 2000.

TENG, Y.-T. A. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 5269–5273, 2002.

TEODORESCU, A. C. et al. Assessment of salivary levels of RANKL and OPG in aggressive versus chronic periodontitis. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

TSO, G. H. W. et al. Phagocytosis of apoptotic cells modulates mesenchymal stem cells osteogenic differentiation to enhance IL-17 and RANKL expression on CD4+ T cells. **Stem cells**, v. 28, n. 5, p. 939–954, 2010.

UDA, Y. et al. Osteocyte mechanobiology. **Current osteoporosis reports**, v. 15, n. 4, p. 318–325, 2017.

WARA-ASWAPATI, N. et al. RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 6, p. 1062–1069, 2007.

WHYTE, M. P. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF- κ B signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1068, n. 1, p. 143–164, 2006.

WU, Y. et al. Effect of aging on periodontal inflammation, microbial colonization, and disease susceptibility. **Journal of dental research**, v. 95, n. 4, p. 460–466, 2016.

XIONG, J. et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138189, 2015.

XU, L. et al. The anticancer potential of apigenin via immunoregulation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 4, p. 479–489, 2021.

YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, 2013.

ZHANG, X. et al. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 407, n. 1, p. 41–50, 2015.

ZHANG, X. et al. The antidepressant effects of apigenin are associated with the promotion of autophagy via the mTOR/AMPK/ULK1 pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 3, p. 2867–2874, 2019.

ZHAO, F. et al. Apigenin attenuates acrylonitrile-induced neuro-inflammation in rats: involved of inactivation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 75, p. 105697, 2019.

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

ZHOU, S. et al. Application of Ginsenoside Rd in Periodontitis With Inhibitory Effects on Pathogenicity, Inflammation, and Bone Resorption. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 387, 2022.

ZHOU, Z. et al. Apigenin suppresses the apoptosis of H9C2 rat cardiomyocytes subjected to myocardial ischemia-reperfusion injury via upregulation of the PI3K/Akt pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 2, p. 1560–1570, 2018.

ZUPAN, J.; JERAS, M.; MARC, J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochemia medica**, v. 23, n. 1, p. 43–63, 2013.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DA *Matricaria recutita* E DA APIGENINA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM CAMUNDONGOS” PELO CEUA



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurocéllo Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: “**Avaliação da atividade antirreabsortiva da *Matricaria recutita* e da apigenina na periodontite induzida por ligadura em camundongos**”, registrada com o nº **05/19**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Iracema Matos de Melo** 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 10/09/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/09/2019 até 01/07/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênico Swiss
Nº de animais	Camundongos: 189
Peso/Idade	Camundongos: 30g/2-3meses
Sexo	♂ (machos)
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 15 de setembro de 2019.

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