



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

FERNANDA REZENDE SILVA MARTINS DE OLIVEIRA

**Efeito da suplementação com resveratrol e quercetina sobre o
desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos**

Araçatuba
2021

FERNANDA REZENDE SILVA MARTINS DE OLIVEIRA

Efeito da suplementação com resveratrol e quercetina sobre o desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba
2021

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram durante esta jornada.

Aos meus pais Claudio e Meiry, por fazerem o impossível para que eu pudesse concluir este curso. Se hoje estou aqui, foi por que vocês aceitaram se lançar ao desconhecido.

Nós conseguimos.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA- UNESP, por me oferecer toda a infraestrutura e todos os recursos necessários para que eu tivesse uma formação de excelência.

A todos os professores e funcionários que através dos seus esforços diários permitiram que concluísse a graduação, em meio a anos pandêmicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por conceder uma bolsa de Iniciação Científica para a realização do trabalho.

Aos meu pais, Claudio Augusto e Meiry, por sempre acreditar nos meus sonhos, me proporcionar o estudo e a possibilidade de ter uma formação. Obrigada por tudo que já fizeram, e ainda fazem por mim, por sempre priorizarem minha educação e abrirem mão dos próprios sonhos pelos meus. Por me ensinar a importância da educação e da humildade. Só tenho a agradecer, e dedicar minha formação a vocês. Essa conquista é nossa.

A minha irmã e melhor amiga Bruna, pelo companheirismo durante a faculdade, por toda motivação, principalmente nas dificuldades. Por me ajudar nas provas e trabalhos. Sempre uma boa ouvinte nos momentos necessários. Com certeza foi imprescindível para minha formação.

A meu orientador João Eduardo Gomes-Filho, pela generosidade de me receber no departamento como aluna de Iniciação Científica. Pela orientação a mim dada de maneira tão graciosa e humana. Uma pessoa incrível, sempre com belas palavras e com poder motivacional. Agradeço por compartilhar seu conhecimento científico e de vida.

Ao Renan Dal Fabbro, pela paciência por me ensinar cada passo da pesquisa, pela confiança depositada a mim, por toda a ajuda durante a iniciação científica, e pelo trabalho incrível. Com certeza sem sua dedicação e suporte nada disso seria possível.

A todo Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, disciplina de Endodontia. Em especial ao Leopoldo e Flávia.

A Carmen Rita, por me receber tão bem em seu consultório no período de estágio. Por depositar confiança a mim em tão pouco tempo. Por ter a sensibilidade de ouvir meus problemas e me ajudar. Por todo conhecimento odontológico, de vida e de gestão passados a mim de forma genuína.

À Banca Examinadora, Prof. Dr, João Eduardo Gomes-Filho, Prof. Dr. Edilson Ervolino, e ao Dr, Renan Dal Fabbro por aceitarem a avaliar meu trabalho.

Aos meus animais de estimação, Clara, Amora, Mel e Gisele, por me ajudar a distrair nos dias difíceis, por mostrar amor em pequenos gestos, pela companhia durante as madrugadas de estudo.

Aos amigos que Araçatuba me presenteou, José Eduardo Martins, Aislan Renato e João Carlos. Pelo apoio recebido antes mesmo de entrar na faculdade, por me ajudar nos longos anos de formação.

Aos amigos que encontrei durante a graduação: Maria Clara, Ana Carolina, Káren, Silvio José, Laura, por compartilhar todos os momentos da faculdade e por

construir memórias.

Em especial a Maria Clara, pela amizade fiel nesses anos de graduação. Agradeço por se fazer presente principalmente nos momentos difíceis e pelos conselhos quando necessários.

Ao Pedro Coiado, pelo companheirismo e ajuda nos dilemas da vida. Apoiando e ajudando em todos os momentos. Por ser calma em meio minha ansiedade.

Aos animais do experimento, que mesmo inconscientes colaboraram e colaboram para as pesquisas.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos, e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: Para caminhar.” Eduardo Galeano

OLIVEIRA, F. R. S. M. **Efeito da suplementação com resveratrol e quercetina sobre o desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos.** 2022. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A periodontite apical é uma doença inflamatória de etiologia microbiana causada principalmente pela necrose da polpa dentária e pela contaminação dos canais radiculares. A patogênese desta doença está relacionada com inflamação e repostas imunológicas promovendo a reabsorção óssea na região apical. Resveratrol e quercetina são compostos fenólicos presentes em muitas variedades de comidas e bebidas. Efeitos biológicos do resveratrol foram relatados, incluindo proteção cardiovascular, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, e principalmente, a capacidade de modular a resposta osteo-imune- inflamatória do hospedeiro. A quercetina é outro composto bastante pesquisado, devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e regulação metabólica. Este flavonóide foi relatado por diminuir a osteoclastogênese via inibição do receptor ativador do fator nuclear- κ B ligante (RANKL), envolvido na diferenciação osteoclástica; pode induzir diretamente a apoptose de osteoclastos maduros. O objetivo do trabalho foi analisar e comparar a lesão periapical induzidas em ratos sobre efeito da suplementação de Resveratrol e Quercetina. Foram submetidos dezesseis ratos (*Rattus norvegicus*, da variedade Wistar, albinus), divididos em dois grupos experimentais, Controle (C) e Resveratrol + Quercetina (RQ). Os animais foram pesados no início e ao final do experimento (30º dia), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e RESV+Q. Foi realizado análise microtomográfica da lesão, para comparar o volume em milímetros cúbicos da lesão periapical; análise histológica e imunohistoquímica através de marcadores OPG, RANKL, TRAP, para correlação à osteoclastogêneses; e marcadores IL-1 β , IL-10 e Tnf- α , como indicadores de inflamação local. O presente estudo oferece alguns insights sobre a influência da ingestão de polifenóis no desenvolvimento e progressão da periodontite apical. A suplementação com resveratrol e quercetina atenuou

o processo inflamatório, aumentou a expressão de proteínas anti-inflamatorias como OPG e IL-10, diminuiu a imunomarcção de TRAP, resultando em lesões de menores volumes quando comparadas ao grupo controle.

Palavras-chave: Periodontite Periapical, Resveratrol, Quercetina.

OLIVEIRA, F. R. S. M. **Effect of resveratrol and quercetin supplementation on the development of induced apical periodontitis in rats.** 2022. 33 f. Completion of course work – Faculty of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Apical periodontitis is an inflammatory disease of microbial etiology caused mainly by necrosis of the dental pulp and contamination of the root canals. The pathogenesis of this disease is related to inflammation and immunological responses promoting bone resorption in the apical region. Resveratrol and quercetin are phenolic compounds present in many varieties of foods and drinks. Biological effects of resveratrol have been reported, including cardiovascular, anti-cancer, anti-inflammatory, antioxidant protection, and mainly, the ability to modulate the host's osteo-immune-inflammatory response. Quercetin is another widely researched compound, due to its antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor and metabolic regulation properties. This flavonoid has been reported to decrease osteoclastogenesis via inhibition of the activating receptor for nuclear factor- κ B ligand (RANKL), involved in osteoclastic differentiation; can directly induce apoptosis of mature osteoclasts. The aim of the study was to analyze and compare the periapical lesions induced in rare cases on the effect of supplementation with Resveratrol and Quercetin. Sixteen rats (*Rattus norvegicus*, of the Wistar variety, *albinus*) were submitted, divided into two experimental groups, Control (C) and Resveratrol + Quercetin (RQ). The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment (30th day), with no statistically significant difference between the Control and RESV + Q groups. A microtomographic analysis of the lesion was performed to compare the volume in cubic millimeters of the periapical lesion; histological and immunohistochemistry analysis using OPG, RANKL, TRAP markers for correlation with osteoclastogenesis; and IL-1 β , IL-10 and Tnf- α markers, as indicators of local inflammation. The present study offers some insights into the influence of polyphenol intake on the development and progression of apical periodontitis. Supplementation with resveratrol and quercetin attenuated the inflammatory process, increased the expression of anti-inflammatory proteins such as OPG and IL-10, decreased the immunomarking of

TRAP, resulting in lower volume lesions when compared to the control group.

Keywords: Periapical Periodontitis, Resveratrol, Quercetin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens mostrando aspectos histológicos das regiões periapicais dos grupos Controle (C) e Resveratrol+Quercetina (R+Q). Coloração de hematoxilina-eosina. 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Consumo de ração e água durante o experimento (g/ml/animal).	23
Tabela 2: Peso dos animais de cada grupo (média e desvio padrão) ao início, ao final do experimento e variação em porcentagem	24
Tabela 3: Escores atribuídos e mediana para H&E, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β e IL-10. Média e desvio padrão para o número de células TRAP positivas por mm e volume da lesão periapical (Micro CT).....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Controle
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
H&E	Coloração Hematoxilina-Eosina
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Micro-CT	Tomografia computadorizada de alta resolução
RANKL	Ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante
RQ	Resveratrol + Quercetina
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
TRAP	Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
3.MATERIAIS E MÉTODOS ANIMAIS	18
3.1Administração das dietas.....	19
3.2 Lesão Periapical	19
3.3 Avaliação da alteração de peso dos animais	19
3.4 Análise microtomográfica	19
3.5 Análises histológica e imunohistoquímica	20
3.5 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Avaliação da alteração de peso dos animais	23
4.2 Análises histológica / imunohistoquímica / microtomográfica	24
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	31

1. Introdução

A periodontite apical é uma doença inflamatória de etiologia microbiana causada principalmente pela necrose da polpa dentária e pela contaminação dos canais radiculares (Siqueira & Rocas 2007). A patogênese desta doença está relacionada com inflamação e repostas imunológicas promovendo a reabsorção óssea na região apical (Subramanian & Mickel 2009). Quando a lesão periapical está instalada, citocinas inflamatórias ou interleucinas possuem um papel importante na resposta imune, iniciando e coordenando eventos celulares e regulando a resposta do hospedeiro às endotoxinas. Além disso, a reabsorção óssea que ocorre nestas patologias aparece como um fator determinante à expansão destas lesões, sendo iniciada pela proliferação de células precursoras de osteoclastos imaturos e diferenciação das mesmas em células osteoclásticas maduras que promovem a degradação dos componentes ósseos orgânicos e inorgânicos.

Resveratrol e quercetina são compostos fenólicos presentes em muitas variedades de comidas e bebidas. Recentemente o estudo isolado de sua suplementação tem ganhando ampla atenção da comunidade científica. Efeitos biológicos do resveratrol foram relatados, incluindo proteção cardiovascular (Cao & Li 2004), anticancerígena (Su *et al.* 2007), anti-inflamatória, antioxidante (Rahman 2008), e principalmente, a capacidade de modular a resposta osteoimune- inflamatória do hospedeiro (Casarin *et al.* 2014). Recentemente, Casati *et al.* relataram que a administração de resveratrol mostrou inibir a perda de osso alveolar e reduziu os níveis de interleucina IL-17 no tecido gengival (Casati *et al.* 2013). Também foi relatado que o resveratrol pode inibir o RANKL, COX-2, suprimir a ativação do TNF (Moon *et al.* 2006), bem como induzir a supressão das citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 (Aggarwal *et al.* 2004) que desempenham importante função na osteoclastogênese.

Em outro estudo, avaliou-se a capacidade do resveratrol em proteger o periodonto do dano causado pela periodontite (Liu *et al.* 2010). Análises histológicas e por micro-CT revelaram que a suplementação com resveratrol reparou a perda de osso alveolar em ratos com periodontite. Acredita-se que os efeitos benéficos do resveratrol na formação óssea sejam devidos à sua atividade anti-inflamatória (Nakamura *et al.* 2013), bem como sua semelhança estrutural com vários hormônios que influenciam positivamente a formação óssea (Pervaiz & Holme 2009).

A quercetina é outro composto que vem ganhando espaço nas pesquisas, devido suas propriedades antioxidantes (Jung *et al.* 2013), anti-inflamatórias (Zhang *et al.* 2012), antitumorais (Wong & Chiu 2011) e regulação metabólica (Niklas *et al.* 2012). Este flavonóide foi relatado por diminuir a osteoclastogênese via inibição do receptor ativador do fator nuclear-kB ligante (RANKL), envolvido na diferenciação osteoclástica (Wattel *et al.* 2004); pode induzir diretamente a apoptose de osteoclastos maduros (Wattel *et al.* 2003); e além disso, o uso local de quercetina em uma matriz de colágeno provocou maior formação de novo osso (Wong & Rabie 2008). A dieta suplementada com quercetina também pode reverter a osteopenia em ratos diabéticos (Liang *et al.* 2011), bem como inibir a perda óssea em camundongos ovariectomizados, confirmando seu o efeito benéfico no tecido ósseo em distúrbios ósseos (Tsuji *et al.* 2009).

A maioria das células e moléculas de sinalização envolvidas na patogênese das lesões periodontais também participam nas lesões periapicais (de Souza *et al.* 2006). Assim, uma vez que o osso alveolar se beneficia com o consumo do resveratrol (Casati *et al.* 2013) e da quercetina (Napimoga *et al.* 2013), é provável que haja alterações na formação da lesão periapical em animais sob sua suplementação. Até o momento, não há estudos que relacionem a suplementação de resveratrol e quercetina com a endodontia, e mais especificamente, a possível ação sistêmica desses compostos fenólicos no desenvolvimento lesão periapical. A hipótese nula desse estudo é que não haverá diferença no desenvolvimento da lesão em ambos os

grupos.

2. Objetivos

- ✓ Analisar e comparar histologicamente a lesão periapical;
- ✓ Analisar e comparar o volume em milímetros cúbicos da lesão periapical através de microtomografia computadorizada;
- ✓ Analisar e comparar os tecidos da região periapical de dentes de ratos utilizando a expressão das proteínas TRAP, OPG e RANKL, correlacionadas à osteoclastogênese;
- ✓ Analisar e comparar os tecidos da região periapical de dentes de ratos utilizando a expressão das citocinas e IL-1 β , IL-10 e Tnf- α como indicadores de inflamação local;

3. Materiais e métodos

Animais

O presente estudo foi submetido ao comitê de ética previamente ao início dos experimentos. Dezesesseis ratos (*Rattus norvegicus*, da variedade Wistar, albinus), com peso entre 250 a 300g foram utilizados, os quais foram divididos em 2 grupos experimentais com 8 animais em cada grupo. Os animais ficaram mantidos em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola), ambiente com temperatura (22 \pm 2°C) e ciclo de luz controlado (12/12 h), com acesso livre a água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos experimentais:

- **Controle (C):** Indução da lesão periapical e administração de água via gavagem;
- **Resveratrol + Quercetina (RQ):** Indução da lesão periapical e suplementação via gavagem com uma solução aquosa preparada com os compostos Resveratrol (R5010 - pureza \geq 99% - Sigma) e Quercetina (Q4951 – pureza \geq 95% - Sigma).

3.1 Administração das dietas

Para o grupo Controle (C), 1,3ml de água potável esterilizada foi administrada via gavagem para simular o estresse sofrido pelos outros animais. O grupo RQ recebeu via gavagem 1,3ml de uma solução aquosa contendo os compostos resveratrol e quercetina nas concentrações de 1 mg/L e 0,86 mg/L respectivamente. Para ambos os grupos, tanto água via bebedouro quanto ração sólida (Labina- Purina®, Paulínia, Brasil) ficaram livremente disponíveis ao longo do experimento.

3.2 Lesão Periapical

A indução da lesão periapical foi realizada sob efeito de anestesia geral com Ketamina-80mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina-4mg/kg (Moby Corp. Shawnee, KS), através da abertura coronária dos primeiros molares superiores e inferiores de ambos os lados (4 dentes) (Cintra *et al.* 2016) com auxílio de broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck - Maillefer, Dentsply) com 0,1mm de diâmetro, desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro. A lesão foi analisada após 30 dias da indução.

3.3 Avaliação da alteração de peso dos animais

Os animais foram pesados ao primeiro e último dia do experimento (trigésimo dia). A alteração de peso foi obtida em porcentagem considerando o peso inicial e final. Além disso, a quantidade de alimentos sólidos e líquidos também foram monitorados e tabulados diariamente.

3.4 Análise microtomográfica

O primeiro molar inferior direito foi utilizado para análise microtomográfica. Após a fixação dos espécimes, a formalina neutra foi reduzida por meio da sua remoção e colocação dos espécimes em água destilada por pelo menos 1 hora antes do escaneamento (Martins *et al.* 2016). As amostras foram escaneadas pelo sistema de imagem

SkyScan 1272 (Kontich, Bélgica). Este sistema permite escaneamento a 100kV, 250 μ A e um detector de raio-X: 11 Mp (4032x2688 pixels) 14-bit., com resolução nominal de 0,45 mm a 27 mm e espaço de escaneamento de 75 mm de diâmetro e 70 mm comprimento. Todo o sistema está conectado a computador Dell, modelo Precision T7610 (Dell Inc. São Paulo, SP, Brasil) com processadores Intel(R) XEON(R) CPU E5-2687w v2 3,40 GHz. O volume de interesse incluiu o espaço de reabsorção óssea perirradicular envolvendo a raiz distal do primeiro molar inferior direito (Austah *et al.* 2016). Os dados volumétricos foram utilizados para gerar imagens reconstruídas em três dimensões (3D). Para quantificar a perda óssea periapical, o volume da imagem foi orientado de modo que o longo eixo da raiz distal do primeiro molar inferior direito fique paralelo aos planos coronal e sagital, e assim, o volume compreendido entre o ápice da raiz e o osso alveolar periapical foi medido em milímetros cúbicos (Kalatzis-Sousa *et al.* 2017).

3.5 Análises histológica e imunohistoquímica

Os primeiros molares inferiores do lado esquerdo foram utilizados para análise histológica e imunohistoquímica. Logo após a remoção das mandíbulas, elas foram fixadas em formalina neutra (10%), durante 24 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA (10%), lavadas em água corrente (24 horas), desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina pelo método de rotina. Nos blocos obtidos, cortes semi-seriados foram realizados em micrótomo (Leica - RM 2045), com 06 micrômetros de espessura. Para cada espécime, 2 lâminas com 3 cortes teciduais, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina e outras 6 lâminas foram submetidas à técnica de imunohistoquímica, para os marcadores biológicos OPG, RANKL, TRAP, IL-1 β , IL-10 e Tnf- α .

A análise histológica da raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo serviu para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (Gomes-Filho *et al.* 2015). As lâminas contendo os cortes

representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica por meio qualitativo através de escores (Gomes-Filho *et al.* 2015), graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada. As variáveis estudadas foram: infiltrado inflamatório quanto à sua intensidade e extensão, e perda de estrutura óssea periapical.

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em torno da área periapical da raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo, em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário. Foram considerados os escores: 0 (ausente ou poucas células inflamatórias), pontuação 1 (até 25 células e reação leve), pontuação 2 (25-125 células inflamatórias e reação moderada) e pontuação 3 (mais de 125 células e reação grave) (Gomes-Filho *et al.* 2015).

Para a técnica da imunistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e desidratados em etanol. A recuperação antigênica realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunistoquímica, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas então foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida (anticorpos primários (1:100) contra a OPG (Rabbit anti-OPG – SC11383), RANKL (Goat anti-RANKL – SC7627), TRAP (Goat anti-TRAP - SC30832), IL-1 β (Goat anti- IL-1 β - SC7884), IL-10 (Goat anti- IL-10 - SC7888) e TNF- α (Goat anti-TNF- α SC1348). Nas etapas subsequentes empregamos o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako

Laboratories, CA, USA). As secções histológicas ficaram incubadas no anticorpo secundário universal biotilado (Universal LSAB⁺ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat), durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação o cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) foi utilizado e em seguida a contracoloração realizada com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

A análise imunoistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal por um investigador cego e calibrado. RANKL, OPG, IL-1 β , IL-10 e TNF- α foram analisadas nas adjacências da lesão periapical com um aumento de 400x. A imunomarcção ficou definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. O padrão de imunomarcção foi atribuído em escore, onde: 0 (ausência completa de células imunorreativas (IR); 1 (baixo IR), poucas células imunorreativas e marcação fraca da matriz extracelular (aproximadamente um quarto das células IR); 2 (IR moderado), número moderado de células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular (aproximadamente metade das células imunorreativas); e 3 (IR elevado), grande número de células IR e forte marcação da matriz extracelular (aproximadamente três quartos das células IR) (Gomes-Filho *et al.* 2015).

Somente osteoclastos maduros ou células multinucleadas TRAP-positivas foram quantificados. Para esta quantificação, inicialmente determinamos o perímetro da lesão ao nível ósseo, em seguida quantificamos as células multinucleadas no perímetro, e por fim expressamos em células TRAP-positivas multinucleadas por mm.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, EUA). Após o teste de normalidade, o teste de Mann-Whitney foi realizado para dados não paramétricos e o teste t de Student foi realizado para dados paramétricos. O nível de significância foi de 5%.

4. Resultados

4.1 Avaliação da alteração de peso dos animais

A quantidade de ração e água foram monitorados diariamente (Tabela 1). Os animais foram pesados no início e ao final do experimento (30^o dia). A alteração de peso foi obtida em porcentagem considerando o peso inicial e final, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e RESV+Q (Tabela 2).

Tabela 1: Consumo de ração e água durante o experimento (g/ml/animal).

Dia	Controle	RESV+Q	10°	15,0 / 59	15,7 / 53	21°	22,4 / 74	22,7 / 75
	Ração (g) / água (ml)	Ração (g) / água (ml)						
1°	10,5 / 40	11,7 / 40	11°	14,2 / 60	14,6 / 54	22°	22,7 / 75	24,6 / 76
2°	11,6 / 41	12,5 / 42	12°	16,7 / 61	16,2 / 57	23°	23,4 / 80	22,8 / 77
3°	11,3 / 45	11,9 / 43	13°	16,3 / 63	15,3 / 58	24°	22,1 / 81	23,2 / 80
4°	12,5 / 47	12,7 / 43	14°	15,1 / 66	16,5 / 64	25°	24,6 / 85	24,1 / 80
5°	13,6 / 48	13,9 / 45	15°	14,7 / 67	17,1 / 64	26°	21,7 / 85	25,5 / 82
6°	11,7 / 49	14,0 / 46	16°	18,9 / 67	18,5 / 67	27°	23,1 / 85	25,8 / 83
7°	15,7 / 50	14,2 / 46	17°	18,2 / 69	18,1 / 68	28°	22,9 / 87	24,7 / 87
8°	14,6 / 58	13,8 / 50	18°	17,6 / 72	19,2 / 69	29°	26,7 / 88	27,0 / 87
9°	15,2 / 59	15,6 / 51	19°	21,2 / 73	17,6 / 72			
			20°	20,5 / 73	21,2 / 74			

Tabela 2: Peso dos animais de cada grupo (média e desvio padrão) ao início, ao final do experimento e variação em porcentagem

	Peso (g)	
	Controle	Resv + Q
Inicial	254,0 ± 11,0	251,5 ± 11,1
Final	434,4 ± 9,5	438,1 ± 10,4
Variação %	71,00% ^a	74,10% ^a

Letras diferentes indicam diferenças significativas nas linhas (P <0,05).

4.2 Análises histológica / imunohistoquímica / microtomográfica

Tabela 3: Escores atribuídos e mediana para H&E, RANKL, OPG, TNF- α , IL-1 β e IL-10. Média e desvio padrão para o número de células TRAP positivas por mm e volume da lesão periapical (Micro CT).

Análise	Escore	
	C	R+Q
	0	0/8
		0/8

H&E	1	0/8	6/8
	2	5/8	2/8
	3	3/8	0/8
	Median	2 ^a	1 ^b
	<hr/>		
RANKL	0	0/8	0/8
	1	3/8	5/8
	2	5/8	3/8
	3	0/8	0/8
	Median	2 ^a	1 ^a
<hr/>			
OPG	0	0/8	0/8
	1	6/8	0/8
	2	2/8	6/8
	3	0/8	2/8
	Median	1 ^a	2 ^b
<hr/>			
TNF-α	0	0/8	0/8
	1	3/8	6/8
	2	5/8	2/8
	3	0/8	0/8
	Median	2 ^a	1 ^a
<hr/>			
IL-1β	0	0/8	0/8
	1	3/8	5/8
	2	5/8	2/8
	3	0/8	1/8
	Median	2 ^a	1 ^a
<hr/>			
IL-10	0	0/8	0/8
	1	6/8	1/8
	2	2/8	7/8
	3	0/8	0/8
	<hr/>		

		Median	1 ^a		2 ^b
TRAP (cells/mm²)		Mean	3.07 ± 0.35 ^a		1.87 ± 0.36 ^b
Micro (mm³)	CT	Mean	0.887 ± 0.108 ^a	±	0.505 ± 0.219 ^b

Letras diferentes indicam diferenças significativas nas linhas (P < 0,05).

Em ambos os grupos a formação da periodontite apical foi observada, comprovando a efetividade do modelo escolhido para indução. Os animais do grupo R+Q apresentaram em sua maioria um padrão inflamatório menos acentuado, com menor presença de células inflamatórias e áreas de reabsorção menores quando comparado com os animais do grupo C (P < 0.05). Para os marcadores RANKL, TNF- α e IL-1 β , uma expressão superior foi notada no grupo C quando comparado ao grupo tratado (R+Q), entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (P > 0.05). Já para os marcadores anti-inflamatórios OPG e IL-10, tivemos uma marcação superior no grupo R+Q frente ao C, de maneira significativa (P < 0.05). A marcação de TRAP foi altamente específica para identificarmos osteoclastos. O grupo R+Q apresentou uma redução do número de células TRAP positivas (1.87 ± 0.36) quando comparada ao grupo C (3.07 ± 0.35), (P < 0.05). O mesmo resultado foi confirmado através da análise volumétrica microtomográfica realizada nas mandíbulas direitas. O grupo R+Q apresentou volume médio de 0.505 ± 0.219, inferior ao grupo controle que mostrou um volume de 0.887 ± 0.108, (P < 0.05).

Tabela 3, Figura 1.

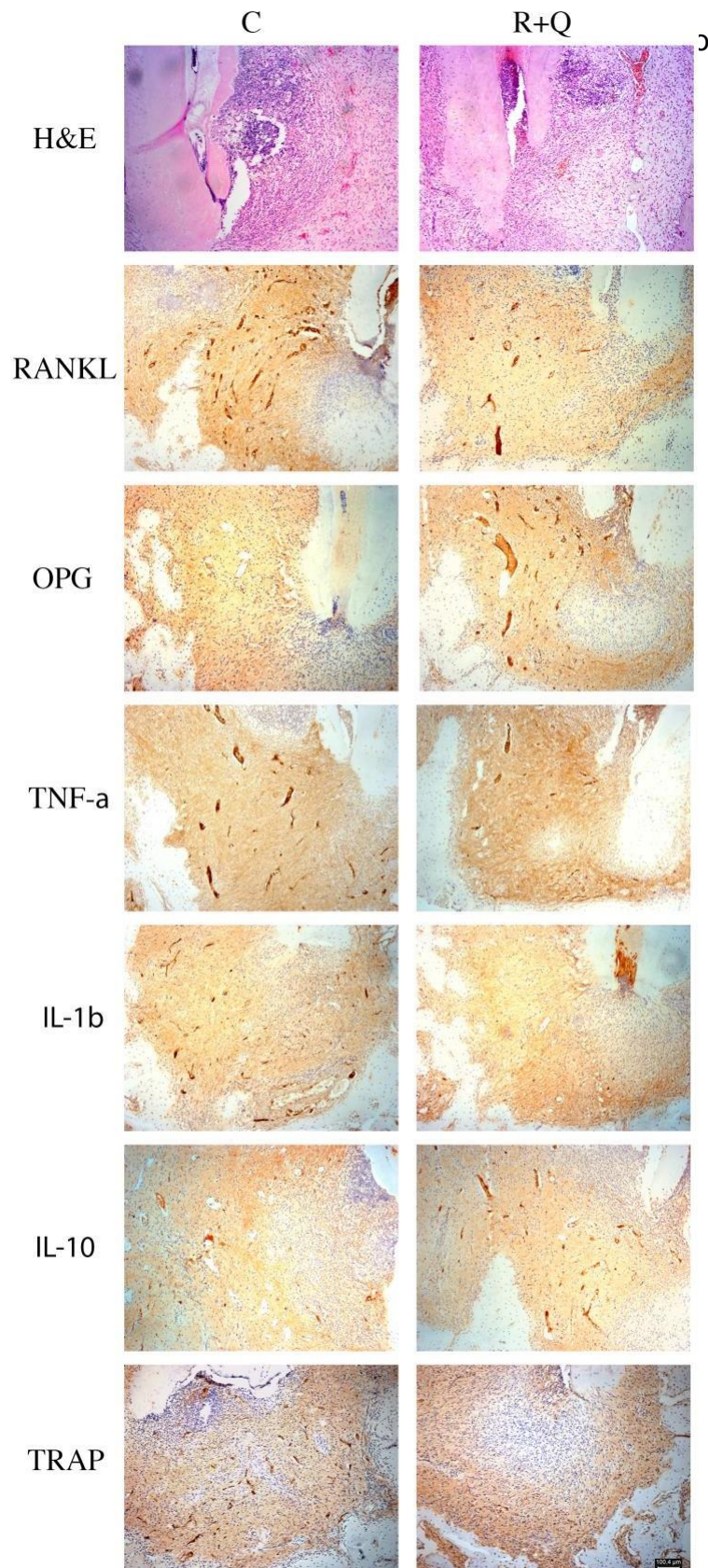


Figura 1: Imagens mostrando aspectos histológicos das regiões periapicais dos grupos Controle (C) e Resveratrol+Quercetina (R+Q). Coloração de hematoxilina-eosina.

4. Discussão

Polifenóis (resveratrol e quercetina) tem recebido atenção mundial devido às suas propriedades terapêuticas e aos seus benefícios para a saúde, com alguns estudos já publicados na área da periodontia (Casati *et al.* 2013, Casarin *et al.* 2014, Correa *et al.* 2018, Ribeiro *et al.* 2019). Este é o primeiro estudo investigando o efeito da suplementação com resveratrol e quercetina sobre o desenvolvimento da periodontite apical através da análise histológica do infiltrado inflamatório, da imunomarcagem para RANKL, OPG, TRAP, IL-10, IL-1 β e TNF- α , além da análise microtomográfica. A hipótese nula foi rejeitada uma vez que a suplementação com resveratrol e quercetina atenuou o processo inflamatório, aumentou a expressão de proteínas anti-inflamatorias como OPG e IL-10, diminuiu a imunomarcagem de TRAP, resultando em lesões de menores volumes quando comparadas ao grupo controle.

A metodologia da indução da lesão periapical em ratos escolhida para este estudo foi utilizada devido à similaridade da resposta periapical à exposição pulpar com aquelas observadas em humanos (Tani-Ishii *et al.* 1994), e o tempo de desenvolvimento (30 dias), considerado suficiente para desenvolvimento pleno e estável da lesão apical (Hirai *et al.* 2018). A administração da suplementação via gavagem permite um controle preciso da quantidade dos compostos que seriam ingeridos pelo animal, diferentemente do que ocorreria caso essa solução ficasse disponível livremente para o consumo. Em nosso estudo, os animais apresentaram ganho de peso semelhante ao decorrer do tempo, sem influência da suplementação dos polifenóis.

Vários ensaios clínicos demonstraram diminuição nos mediadores inflamatórios séricos, incluindo proteína C reativa de alta sensibilidade e citocinas pró-inflamatórias por resveratrol e quercetina (Timmers *et al.* 2011, Militaru *et al.* 2013). Em nosso modelo experimental, um processo inflamatório de menores proporções, aliados à uma menor reabsorção óssea, puderam ser observados na análise

histológica. Resultado corroborado pela redução da expressão das citocinas TNF- α e IL-1 β , mesmo que sem diferença estatística.

Um quadro de processo inflamatório associado a periodontite apical de menor extensão e intensidade no grupo R+Q, foi verificado pela análise histológica, quando comparado ao outro grupo. Este achado concorda com achados publicados na literatura evidenciando atividade anti-inflamatória dos dois polifenóis. O Resveratrol atua em diferentes fases do processo inflamatório, protegendo o organismo da inflamação (Das & Das, 2007). A atividade anti-inflamatória pode ocorrer por meio da inibição de ambas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX- 2) sinalização pró-inflamatória mediada, supressão da produção de mediador pró-inflamatório, atuando no fator de transcrição nuclear - k B (NFkB) em macrófagos inibição, suprimindo a liberação de interleucina-6 e interleucina-8, que desempenha um papel importante na inflamação, como recrutar leucócitos para a área da lesão (Das & Das, 2007). A quercetina diminui a expressão da sintase do óxido nítrico, inibe as metaloproteinases da matriz, inibe a produção de enzimas promotoras de inflamação (COX) e lipoxigenase (LOX), bloqueia o TNF- α e impede que ele de ativar diretamente a quinase relacionada ao sinal extracelular (ERK) e (NF- k B), que são potentes indutores de processos inflamatórios expressão gênica e secreção de proteínas (Li et al., 2016)

O tecido ósseo está em constante renovação (remodelação). As células responsáveis por esse processo são os osteoblastos (deposição óssea) e os osteoclastos (reabsorção óssea). Em uma situação normal, as atividades dessas células costumam ser equilibradas, de modo que não há aumento ou perda de massa óssea. O controle desse metabolismo é um fator chave na obtenção de uma redução na reabsorção óssea em doenças inflamatórias (Eriksen 2010), como na periodontite apical. Portanto, o uso de substâncias capazes de interferir positivamente nos processos inflamatórios que levam à reabsorção óssea devem ser consideradas.

A descoberta da via RANKL/OPG contribuiu para o entendimento de como a formação e reabsorção óssea eram

processadas e reguladas (Silva & Branco 2011). Embora em nosso estudo a suplementação com resveratrol e quercetina reduziu a imunomarcção de RANKL, porém sem diferença estatística, ela foi capaz de aumentar de maneira significativa a expressão de OPG, uma proteína osteoprotetora que impede a ligação do RANKL ao RANK, e dessa maneira bloqueia a cadeia de eventos necessários para a formação osteoclástica (Silva & Branco 2011). Essa eventual redução da formação dos osteoclastos vai de encontro aos resultados observados para imunomarcção de TRAP (marcador histoquímico de osteoclastos), onde observamos uma menor quantidade de células multinucleadas TRAP positivas depositadas no perímetro e proximidades da periodontite apical por milímetro no grupo tratado. Resultado este que corrobora com os achados microtomográficos, onde uma menor perda óssea volumétrica foi observada nos animais que receberam a solução contendo os polifenóis.

O efeito benéfico do consumo de resveratrol na redução da perda óssea alveolar observado neste estudo parece estar associado à modulação da reação imunoinflamatória, conforme apontado anteriormente por outras pesquisas utilizando diferentes modelos experimentais, como os previamente publicados por Casati *et al.* (2013) que relataram que a administração de resveratrol inibiu a perda óssea alveolar e reduziu os níveis de interleucinas pró-inflamatórias no tecido gengival; além disso, Shakibaei *et al.* (2011) demonstraram que o resveratrol pode inibir RANKL, bem como COX-2, IL-1 e IL-6, que desempenham um papel importante na osteoclastogênese. Outros componentes, como a quercetina, têm a capacidade de diminuir a liberação de mediadores inflamatórios e induzir a diferenciação de células-tronco mesenquimais na linhagem osteoblástica (Gomez-Florit *et al.* 2015). De maneira complementar, a quercetina também mostrou um efeito inibidor potente na diferenciação de osteoclastos e na área óssea reabsorvida por essas células de maneira dose-dependente, mesmo em concentrações muito baixas (Wattel *et al.* 2004).

O presente estudo oferece alguns insights sobre a influência da ingestão de polifenóis no desenvolvimento e progressão da periodontite

apical. No entanto, devido a algumas limitações, os resultados não podem ser extrapolados para a clínica diretamente. Portanto, mais estudos são encorajados considerando alguns parâmetros relevantes, como as dosagens dos polifenóis, a via de administração, e o tempo de consumo pré e pós indução da lesão.

5. Conclusão

O presente estudo mostrou que a suplementação com resveratrol e quercetina foi capaz de atenuar o processo inflamatório, aumentando a expressão de proteínas anti-inflamatorias como OPG e IL-10, diminuindo a imunomarcagem de TRAP, resultando em lesões de menores volumes quando comparadas ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies *Anticancer Research* **24**, 2783-840.
- Austah ON, Ruparel NB, Henry MA, Fajardo RJ, Schmitz JE, Diogenes A (2016) Capsaicin- sensitive Innervation Modulates the Development of Apical Periodontitis *Journal of Endodontics* **42**, 1496-502.
- Cao Z, Li Y (2004) Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury *European Journal of Pharmacology* **489**, 39-48.
- Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP *et al.* (2014) Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **43**, 900-6.
- Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G *et al.* (2013) Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats *Journal of Periodontology* **84**, e58-64.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM *et al.* (2016) Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide *Journal of*

Endodontics **42**, 747-51.

Correa MG, Pires PR, Ribeiro FV *et al.* (2018) Systemic treatment with resveratrol reduces the progression of experimental periodontitis and arthritis in rats *PloS One* **13**, e0204414.

Das, S. & Das, D.K. (2007) Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*, 6, 168–173

de Souza DM, Ricardo LH, Prado Mde A, Prado Fde A, da Rocha RF (2006) The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats *J Appl Oral Sci* **14**, 443-7.

Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **11**, 219-27.

Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RC *et al.* (2015) Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats *Journal of Endodontics* **41**, 671-5.

Das, S. & Das, D.K. (2007) Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*, 6, 168–1

Gomez-Florit M, Monjo M, Ramis JM (2015) Quercitrin for periodontal regeneration: effects on human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells *Scientific Reports* **5**, 16593.

Hirai K, Furusho H, Hirota K, Sasaki H (2018) Activation of hypoxia-inducible factor 1 attenuates periapical inflammation and bone loss *Int J Oral Sci* **10**, 12.

Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY (2013) Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes *Phytotherapy Research* **27**, 139-43.

Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G (2017) Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review *International Endodontic Journal* **50**, 352-66.

Liang W, Luo Z, Ge S *et al.* (2011) Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia *European Journal of Pharmacology* **670**, 317-24.

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M., Wang, S. *et al.* (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, 8, 167.

- Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W (2010) The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model *Journal of Periodontal Research* **45**, 541-9.
- Martins CM, Sasaki H, Hirai K, Andrada AC, Gomes-Filho JE (2016) Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vitro and in vivo study *Braz Oral Res* **30**, e78.
- Militaru C, Donoiu I, Craciun A, Scorei ID, Bulearca AM, Scorei RI (2013) Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life *Nutrition* **29**, 178-83.
- Moon SO, Kim W, Sung MJ *et al.* (2006) Resveratrol suppresses tumor necrosis factor- α -induced fractalkine expression in endothelial cells *Molecular Pharmacology* **70**, 112-9.
- Nakamura H, Aoki K, Masuda W *et al.* (2013) Disruption of NF-kappaB1 prevents bone loss caused by mechanical unloading *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 1457-67.
- Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT, Macedo CG *et al.* (2013) Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model *Journal of Natural Products* **76**, 2316-21.
- Niklas J, Nonnenmacher Y, Rose T, Sandig V, Heinzle E (2012) Quercetin treatment changes fluxes in the primary metabolism and increases culture longevity and recombinant alpha(1)- antitrypsin production in human AGE1.HN cells *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**, 57-67.
- Pervaiz S, Holme AL (2009) Resveratrol: its biologic targets and functional activity *Antioxid Redox Signal* **11**, 2851-97.
- Rahman I (2008) Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation *Nutrition Reviews* **66 Suppl 1**, S42-5.
- Ribeiro FV, Pimentel SP, Correa MG, Bortoli JP, Messoria MR, Casati MZ (2019) Resveratrol reverses the negative effect of smoking on peri-implant repair in the tibia of rats *Clinical Oral Implants Research* **30**, 1-10.
- Shakibaei M, Buhrmann C, Mobasheri A (2011) Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB

ligand (RANKL) activation of NF- κ B signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells *Journal of Biological Chemistry* **286**, 11492-505.

Silva I, Branco JC (2011) Rank/Rankl/opg: literature review *Acta Reumatol Port* **36**, 209-18.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN (2007) Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis *Brazilian Dental Journal* **18**, 267-80.

Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yen ML (2007) Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19385-98.

Subramanian K, Mickel AK (2009) Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile *Journal of Endodontics* **35**, 950-7.

Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P (1994) Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions *Oral Microbiology and Immunology* **9**, 129- 35.

Timmers S, Konings E, Bilet L *et al.* (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans *Cell Metabolism* **14**, 612-22.

Tsuji M, Yamamoto H, Sato T *et al.* (2009) Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **27**, 673-81.

Wattel A, Kamel S, Mentaverri R *et al.* (2003) Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption *Biochemical Pharmacology* **65**, 35-42.

Wattel A, Kamel S, Prouillet C *et al.* (2004) Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF κ B and AP-1 *Journal of Cellular Biochemistry* **92**, 285-95.

Wong MY, Chiu GN (2011) Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **7**, 834-40.

Wong RW, Rabie AB (2008) Effect of quercetin on preosteoblasts and bone defects *Open Orthopaedics Journal* **2**, 27-32.

Zhang H, Zhang M, Yu L, Zhao Y, He N, Yang X (2012) Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines *Food and Chemical Toxicology* **50**, 1589-99.