



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gabriella de Oliveira

**Impacto da diacereína sobre citocinas envolvidas na formação e reabsorção
óssea na periodontite induzida em molares de rato**

Araraquara
2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gabriella de Oliveira

**Impacto da diacereína sobre citocinas envolvidas na formação e reabsorção
óssea na periodontite induzida em molares de rato**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia na área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri
Coorientadora: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

Araraquara
2024

O48i	Oliveira, Gabriella de Impacto da diacereína sobre citocinas envolvidas na formação e reabsorção óssea na periodontite induzida em molares de rato / Gabriella de Oliveira. -- Araraquara, 2024 64 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Paulo Sérgio Cerri Coorientadora: Estela Sasso Cerri 1. Perda do Osso Alveolar. 2. Periodontite. 3. Anti-inflamatórios. 4. Apoptose. 5. Imunomodulação. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriella de Oliveira

**Impacto da diacereína sobre citocinas envolvidas na formação e reabsorção
óssea na periodontite induzida em molares de rato**

Comissão julgadora

**Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Odontologia na
área de Periodontia**

Presidente e orientador: Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Victor Elias Arana-Chavez

3º Examinador: Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 15 de março de 2024.

DADOS CURRICULARES

Gabriella de Oliveira

NASCIMENTO: 03/03/2000 - Franca - SP

FILIAÇÃO: Marcus Rogério de Oliveira e Luciana Adorno de Oliveira

2018/2021 - Graduação em Odontologia pela Universidade de Araraquara

2022/2024: Mestranda em Odontologia (Área de Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FOAr-UNESP).

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcus Rogério de Oliveira e Luciana Adorno de Oliveira, meus eternos professores e meus maiores exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por sempre me apoiarem, protegerem e ensinarem a importância do conhecimento, da curiosidade e do estudo.

Aos meus avós, que sempre tiveram a visão mais linda de mim, me ensinaram a ter humildade e aproveitar as pequenas coisas.

Ao meu orientador, professor Dr. Paulo Sérgio Cerri, por me aceitar como orientanda e por tanto conhecimento compartilhado, me mostrando como a Histologia pode ser bonita, espero ter mostrado meu potencial. Também à professora Estela, a nossa figura materna, suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso, a senhora me ensinou a buscar novos pontos de vista.

Ao meu amigo André Acácio Souza da Silva, aluno de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UNIFESP/EPM (São Paulo) por toda a paciência para me ensinar a fazer o RT-qPCR e me acompanhar até que eu pudesse caminhar com minhas próprias pernas.

Aos meus amigos e amigas do laboratório da Disciplina de Histologia e Embriologia que estiveram ao meu lado tanto para me ensinar e aconselhar, como nos momentos descontraídos: Lucas, Lays, Evelin, Arles, Salmo. Também à professora Dra. Isabel Porto que, além de excelente professora de Histologia e Embriologia, se tornou uma grande amiga para todos os momentos.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu pela disponibilidade do microscópio eletrônico de transmissão.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2021/05968-0) pelo apoio financeiro concedido através do Auxílio à Pesquisa e da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2022/07682-9), essenciais para realização dessa pesquisa.

Oliveira G. Impacto da diacereína sobre citocinas envolvidas na formação e reabsorção óssea na periodontite induzida em molares de rato [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

Diversos agentes bioativos como interleucinas (IL), metaloproteinases da matriz e fatores de transcrição que estimulam a osteoclastogênese e inibem diferenciação de osteoblastos. A diacereína é um anti-inflamatório usado no tratamento de osteoartrite, cuja fisiopatologia é similar à periodontite. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da diacereína sobre as citocinas envolvidas na formação e atividade de osteoclastos do osso alveolar de ratos com periodontite. Além disso, foi investigado se a diacereína interfere na diferenciação de osteoblastos. Foram utilizados 108 ratos *Holtzman*, distribuídos nos grupos GPD (grupo com periodontite e tratado com 100mg/kg de diacereína), GPS (grupo com periodontite e tratado com solução salina) e GC (Grupo controle, periodonto saudável sem qualquer tratamento). A periodontite foi induzida por ligadura no 1º molar superior direito. Após 7 dias, a ligadura foi removida e o tratamento foi iniciado. Os animais foram eutanasiados após 7, 15 e 30 dias do início do tratamento. Cortes foram corados com tricrômico de Gomori para análise morfológica ou submetidos às reações imuno-histoquímicas/imunofluorescência para detecção da fosfatase alcalina (ALPase), F4/80 (fagócitos mononucleares) e caspase-3, e ao método do TUNEL. As características ultraestruturais dos osteoclastos também foram avaliadas. Amostras de mucosa gengival foram coletadas para análise da expressão gênica de *Tnf*, *Il1b*, *Tnfsf11* e *Tnfrsf11b* por RT-qPCR. Os dados foram submetidos ao Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A análise de expressão gênica foi realizada por meio do método $\Delta\Delta CT$ para quantificação relativa, e submetidos ao One-way ANOVA. O nível de significância considerada foi $p < 0,05$. Espécimes do GPD e GPS mostraram evidente processo inflamatório na mucosa gengival com aumento significativo de macrófagos F4/80. Nas amostras gengivais do GPD, a expressão dos genes *Tnf*, *Il1b* e *Tnfsf11* reduziram significativamente em comparação ao GPS, com exceção da expressão de *Tnf* aos 7 dias. Houve também uma redução na razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (*RANKL/OPG*) no grupo GPD. Os espécimes do GPD exibiram frequência de osteoclastos TUNEL-positivos significativamente maior em comparação ao GPS ($p < 0,0001$) e GC ($p < 0,0001$), em todos os períodos. Osteoclastos com citoplasma fortemente imunofluorescente à caspase-3 e com núcleos exibindo massas irregulares com conspícua cromatina condensada foram também observados nos espécimes do GPD, confirmando a morte de osteoclastos por apoptose. Em todos os períodos, os espécimes do GPD apresentaram um significativo aumento no número de osteoblastos ALPase-positivos em comparação ao GPS. Os nossos resultados sugerem que a diacereína inibe a formação de osteoclastos por meio da redução dos níveis de RNAm de *Tnf* e *Il1b* que culminou na redução da razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* e também induziu apoptose em osteoclastos do processo alveolar de molares com periodontite. Além, o significativo aumento de ALPase nos osteoblastos do GPD aponta para um papel da diacereína na diferenciação de osteoblastos.

Palavras-chave: Perda do Osso Alveolar. Periodontite. Anti-inflamatórios. Apoptose. Imunomodulação.

Oliveira G. Diacerein impact on cytokines involved in the bone formation and resorption during induced periodontitis in rat molars [dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

Several bioactive agents such as interleukins (IL), matrix metalloproteinases, and transcription factors that stimulate osteoclastogenesis and inhibit osteoblastic differentiation are involved in the progression of periodontitis. Diacerein is an anti-inflammatory used in the treatment of osteoarthritis, whose pathophysiology is similar to periodontitis. The aim of the study was to evaluate the effects of diacerein on cytokines involved in the formation and activity of alveolar bone osteoclasts in rats with periodontitis. Moreover, it was investigated whether diacerein interferes with osteoblast differentiation. A total of 108 Holtzman rats were distributed into PDG (periodontitis group treated with 100mg/kg diacerein), PSG (periodontitis group treated with saline solution), and CG (control group, healthy periodontium without any treatment). Periodontitis was induced by ligature on the upper right first molar. After 7 days, the ligature was removed, and the treatment was initiated. The animals were euthanized after 7, 15, and 30 days from the beginning of the treatment. Sections were stained with Gomori's trichrome for morphological analysis or subjected to immunohistochemical/immunofluorescence reactions to detect alkaline phosphatase (ALPase), F4/80 (mononuclear phagocytes), and caspase-3, as well as to the TUNEL method. The ultrastructural features of osteoclasts were also evaluated. Gingival mucosa samples were collected for analysis of *Tnf*, *Il1b*, *Tnfsf11* (RANKL), and *Tnfrsf11b* (OPG) gene expression by RT-qPCR. Data were subjected to Two-way ANOVA and Tukey's post-test. Gene expression analysis was performed using the $\Delta\Delta CT$ method for relative quantification and submitted to One-way ANOVA. Significance was considered at $p < 0.05$. Specimens from PDG and PSG showed evident inflammatory processes in the gingival mucosa with a significant increase in F4/80 macrophages. In PDG gingival samples, the expression of *Tnf*, *Il1b*, and *Tnfsf11* genes reduced significantly compared to PSG, except for *Tnf* expression at 7 days. In the PDG specimens was detected a significant reduction in the mRNA levels of *Tnfsf11*/*Tnfrsf11b* ratio, at all time points. PDG specimens exhibited a significantly higher frequency of TUNEL-positive osteoclasts than in PSG ($p < 0.0001$) and CG ($p < 0.0001$) at all time points. Osteoclasts with cytoplasm strongly immunofluorescent for caspase-3 and nuclei displaying irregular masses with conspicuous condensed chromatin were also observed in PDG specimens, confirming osteoclast apoptosis. At all time points, PDG specimens showed a significant increase in the number of ALPase-positive osteoblasts compared to PSG. Our results suggest that diacerein inhibits osteoclast formation by decreasing *Tnf* and *Il1b* mRNA levels, resulting in the reduction of the *Tnfsf11*/*Tnfrsf11b* (RANKL/OPG) ratio and also induces apoptosis in osteoclasts of molar alveolar processes with periodontitis. Additionally, diacerein possibly stimulates osteoblast differentiation, as there was a significant increase in ALPase in PDG osteoblasts.

Keywords: Alveolar bone loss. Periodontitis. Anti-inflammatory agentes. Apoptosis. Immunomodulation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 PROPOSIÇÃO.....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Periodontite	12
3.2 Características Estruturais do Tecido Ósseo	13
3.3 Citocinas Envolvidas na Remodelação Óssea	16
3.4 Diacereína.....	18
4 MATERIAL E MÉTODO.....	21
4.1 Processamento Laboratorial para Microscopia de Luz	23
4.2 Imuno-Histoquímica Anti-F4/80	24
4.3 Imuno-Histoquímica Anti-Fosfatase Alcalina.....	25
4.4 Reação do TUNEL	26
4.5 Imunofluorescência para Detecção da Caspase-3	27
4.6 Processamento Laboratorial para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	28
4.7 Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR).....	29
4.8 Análise Estatística.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Análise Morfológica	31
5.2 Imuno-Histoquímica Anti-F4/80	33
5.3 Imuno-Histoquímica Anti- Fosfatase Alcalina.....	35
5.4 Osteoclastos TUNEL/TRAP-Positivos, Imunoexpressão de Caspase-3 e Análise Ultraestrutural	37
5.5 Expressão Gênica (RT-qPCR).....	42
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	62
ANEXO B	63
ANEXO C	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
ALPase	Fosfatase Alcalina
CatK	Catepsina K
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ICE	Caspase-1
IFN- γ	Interferon- γ
IL-13	Interleucina 13
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
I κ B- α	Inibidor do NF κ B alfa
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator recrutador de colônia de macrófagos
MMP-8	Metaloproteinase da matriz 8
MMP-9	Metaloproteinase da matriz 9
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas 1
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
PGE2	Prostaglandina E2
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
<i>Tnf</i>	Gene para TNF- α
<i>Il1b</i>	Gene para IL-1 β
<i>Tnfsf11</i>	Gene para RANKL
<i>Tnfrsf11b</i>	Gene para OPG
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é um problema de saúde pública que pode acarretar a perda de dentes devido a reabsorção alveolar e, consequentemente, a perda da função mastigatória, reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos¹. A periodontite é considerada uma doença multifatorial resultante da interação entre os produtos bacterianos do biofilme dental, fatores ambientais como o uso de tabaco e álcool e, principalmente, o perfil inflamatório do hospedeiro^{1,2}. Em vista disso, a imunomodulação do hospedeiro por meio da administração sistêmica de anti-inflamatórios tem sido estudada como uma terapia complementar ao tratamento convencional para periodontite³.

A diacereína é um anti-inflamatório derivado do ruibarbo e utilizado para o tratamento de osteoartrite^{4,5}. Considerando que a periodontite e a osteoartrite são desordens inflamatórias que induzem a reabsorção óssea e, portanto apresentam fisiopatologias semelhantes⁴, principalmente no que se refere as citocinas envolvidas na instalação do processo inflamatório, foi levantada a hipótese de que a diacereína pode auxiliar no tratamento da periodontite, inibindo a reabsorção óssea e acelerando a reparação do osso alveolar.

O objetivo do estudo foi avaliar se a diacereína interfere na expressão de citocinas envolvidas na formação e sobrevivência de osteoclastos, além da diferenciação de osteoblastos, na periodontite induzida em ratos. Com este estudo pretendemos estabelecer uma terapia complementar para o tratamento convencional da periodontite, o que afetar positivamente a qualidade de vida dos pacientes periodontais, evitando a perda de dentes.

2 PROPOSIÇÃO

O propósito do estudo foi investigar se a diacereína interfere na remodelação óssea do processo alveolar de ratos com doença periodontal. Assim, os objetivos específicos foram investigar se a diacereína na periodontite interfere na:

Expressão gênica de *Tnf* (TNF- α), *Il1b* (IL-1 β), *Tnfsf11* (RANKL) e *Tnfrsf11b* (OPG): citocinas e fatores envolvidos na formação e ativação de osteoclastos;

Distribuição e variabilidade das células fagocíticas F4/80 na mucosa gengival;

Morte celular de osteoclastos, utilizando o método do TUNEL e imunofluorescência para caspase-3, além das características ultraestruturais;

Diferenciação de osteoblastos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão foi centrada em tópicos específicos, porém intimamente associados ao tema da pesquisa, com o objetivo de fornecer ao leitor um parâmetro geral do assunto investigado. Dessa maneira, a “Revisão de Literatura” foi subdividida nos seguintes tópicos: periodontite, características estruturais do tecido ósseo, citocinas envolvidas na remodelação óssea e diacereína.

3.1 Periodontite

A periodontite é uma doença imunoinflamatória que ocupa o sexto lugar dentre as doenças de maior prevalência no mundo, afetando cerca de 744 milhões de indivíduos⁶. Há evidência de que a periodontite pode estar relacionada a outras comorbidades tais como doenças respiratórias e cardiovasculares, além de ser agravada por condições sistêmicas como diabetes mellitus e artrite reumatoide⁷. A periodontite é uma doença desencadeada pelo acúmulo de biofilme dental que, embora o recrutamento de células inflamatórias seja desencadeado para combater bactérias anaeróbias Gram-negativas subgengivais, gera uma cascata de eventos celulares e moleculares que acarretam alterações na integridade estrutural dos tecidos periodontais⁸⁻¹⁰. Dentre as alterações, ocorre inicialmente a inflamação gengival reversível (gingivite) que pode progredir para a destruição do periodonto de sustentação, caracterizada pela migração do epitélio juncional, perda de inserção e destruição do ligamento periodontal, formando as chamadas bolsas periodontais e pode resultar em perda dentária^{11,12}.

Apesar do biofilme dental ser um fator essencial para desencadear a inflamação, as doenças periodontais são desordens multifatoriais que dependem da resposta imune do indivíduo e de fatores ambientes e psicossociais¹³⁻¹⁵, ou seja, apenas a presença do biofilme não é capaz de causar a doença periodontal¹⁶. De fato, a progressão e a severidade da periodontite estão relacionadas à interação entre o biofilme disbiótico e a resposta inflamatória do hospedeiro³. Dentre as espécies de bactérias presentes na microbiota oral, as *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* têm sido apontadas e estudadas como as principais espécies causadoras da doença periodontal¹⁷. Quando as bactérias do

biofilme dental entram em contato com o epitélio juncional, inicia-se uma resposta inflamatória marcada pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), além de mediadores secundários, tais como metaloproteinases da matriz (MMPs) e prostaglandina E2 (PGE2)^{3,18,19}. Em doenças inflamatórias ósseas como a periodontite e a osteoartrite, a secreção dessas citocinas causa um desequilíbrio entre a osteogênese e osteoclastogênese, contribuindo para a diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea^{9,10,20}.

De fato, uma das conseqüências marcantes da periodontite é a perda óssea do processo alveolar, acarretando, portanto, perda de inserção de fibras colágenas do ligamento periodontal ao osso alveolar, podendo ocasionar a mobilidade dentária. Diante destas considerações, o conhecimento da complexa série de eventos celulares e moleculares envolvidos com a homeostase óssea e, particularmente, aqueles envolvidos com o processo reabsortivo é fundamental para o estabelecimento de estratégias para amenizar os efeitos deletérios causados pela periodontite. Dessa maneira, o texto a seguir tem a intenção de abordar apenas alguns pontos importantes em relação às características estruturais do tecido ósseo e de suas células.

3.2 Características Estruturais do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado composto por células e uma matriz extracelular com componentes orgânicos (30%), inorgânicos (60%) e água (10%)²¹. Enquanto a matriz orgânica não mineralizada é depositada por osteoblastos e composta principalmente por colágeno tipo I²², a porção inorgânica da matriz é composta, principalmente, por fosfato e cálcio que formam cristais de fosfato de cálcio denominados de hidroxiapatita. A interação dos cristais de hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do osso²³⁻²⁵.

Em condições fisiológicas, o tecido ósseo apresenta quatro tipos de células bem caracterizadas denominadas: osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são oriundos de células mesenquimais cuja diferenciação e maturação dependem de dois fatores de transcrição: Runx2 e Osterix (OSX). Os osteoblastos em atividade são as células polarizadas, com extenso

retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, além de diversas vesículas e mitocôndrias²⁶. Osteoblastos adjacentes à superfície do tecido ósseo são responsáveis pela deposição dos componentes da matriz orgânica, denominada osteoide. A matriz orgânica é composta principalmente por colágeno, cerca de 90%, sendo o colágeno tipo 1 o mais abundante (cerca de 85%), embora outros tipos de colágeno também estejam presentes, dentre eles os tipos III e V. As proteínas não colágenas compõem aproximadamente 10% da matriz e estão representadas pela osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea II e proteoglicanos como biglicano e decorina^{25,27}. Além dos fatores de transcrição, Runx2 e OSX expressos pelos osteoblastos durante sua diferenciação, essas células também expressam a fosfatase alcalina (ALPase) na superfície voltada para o osso. Embora a função desta glicoproteína ainda não esteja completamente elucidada, a ALPase tem sido correlacionada ao processo de mineralização. Dessa maneira, além do osteoblasto ser responsável pela síntese dos componentes da matriz orgânica do tecido ósseo, há evidências de que esta célula tem uma participação na mineralização do tecido, seja por meio da ALPase bem como pela liberação de pequenas vesículas da matriz nos estágios iniciais de mineralização do tecido ósseo. A ALPase cliva o pirofosfato, um inibidor de formação de hidroxiapatita, ao mesmo tempo em que aumenta o fosfato local, essencial para a formação dos cristais de hidroxiapatita²⁷⁻²⁹.

À medida que osteoblastos produzem os componentes da matriz óssea, a maior parte deles se desloca cedendo espaço para a deposição da matriz óssea. No entanto, alguns osteoblastos não se deslocam e, conseqüentemente, são rodeados pela matriz orgânica que, paulatinamente, é mineralizada. Ao ser “aprisionado” pela matriz óssea, o osteoblasto reduz significativamente a sua atividade de síntese e passa a ser denominado osteócito, a célula mais abundante do osso encontrada em pequenas lacunas em meio à matriz óssea mineralizada^{26,30,31}. Os osteócitos apresentam prolongamentos que se estendem pela matriz calcificada por meio de canalículos e estabelecem comunicação com outros osteócitos, vasos sanguíneos, osteoblastos e osteoclastos, tendo sido apontado como responsável pela regulação da reabsorção óssea^{32,33}. Em concordância, Nakashima et al.³⁴ estudaram a influência do osteócito na osteoclastogênese e concluíram que a Dmp1 (proteína da matriz dentinária 1), uma proteína expressa principalmente em osteócitos e essencial para

sua formação e função, é capaz de realizar a deleção seletiva de RANKL, reduzindo o número de osteoclastos³⁵.

Após o osso atingir as suas dimensões, há uma redução do volume dos osteoblastos em consequência da menor atividade de síntese desta célula. Dessa maneira, os osteoblastos perdem sua forma cilíndrica e adquirem um formato pavimentoso, sendo denominadas de células de revestimento. As células de revestimento ósseo recobrem a superfície óssea e possuem potencial de diferenciação, similarmente às células mesenquimais. Portanto, estas células são consideradas osteoblastos latentes que, em certas circunstâncias, podem diferenciar-se em osteoblastos cilíndricos e polarizados comprometidos com a formação óssea³⁶. Adicionalmente, um estudo recente relatou que estas células também estão envolvidas na osteoclastogênese, contribuindo para a formação de progenitores de osteoclastos através da produção de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF)³⁷.

Em contraposição às células associadas à formação e manutenção da matriz óssea, os osteoclastos possuem características particulares e são facilmente identificados, pois são células gigantes multinucleadas localizadas na superfície óssea. Frequentemente, estas células multinucleadas estão justapostas à superfície escavada do tecido ósseo, numa lacuna de reabsorção denominada de lacuna de Howship. Quando ativado, o osteoclasto apresenta especializações em sua membrana, desenvolvendo a borda em escova, região com inúmeras pregas por meio da qual são liberadas diversas enzimas e outras substâncias que acidificam o microambiente da superfície óssea. Além disso, o osteoclasto apresenta a zona clara ou zona de vedação, que isola a borda em escova e a superfície óssea justaposta a ela, formando um microambiente onde ocorre a dissolução da hidroxiapatita e, subsequentemente, a degradação dos componentes da matriz orgânica^{26,38}. A reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos inicia-se com a desmineralização da parte inorgânica do tecido, pela ação do ácido clorídrico liberado por meio da membrana da borda em escova. Após a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, diversas enzimas, dentre elas a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), catepsina K e MMP-9 são liberadas pelo osteoclasto e promovem a degradação dos componentes orgânicos da matriz óssea³¹.

A homeostase óssea é mantida por citocinas e células do sistema imune, mas em condições patológicas, como na periodontite, o equilíbrio pode ser perdido por ação das mesmas^{31,39}. O desequilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica pode resultar em aumento (osteopetrose) ou diminuição (osteoporose) da densidade óssea, sendo que o número de osteoclastos maduros e ativados é diretamente proporcional à intensidade da reabsorção óssea³⁹. Portanto, a formação e atividade de osteoclastos estão diretamente associados à perda óssea alveolar característica da periodontite, doença com aspectos semelhantes à osteoartrite³⁹.

3.3 Citocinas Envolvidas na Remodelação Óssea

Dentre os diversos sinalizadores envolvidos na formação e diferenciação de osteoclastos, destacam-se o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL), que são expressos por pré-osteoblastos (ou células osteoprogenitoras), evidenciando a interação entre formação e destruição óssea³¹. O M-CSF, proveniente de células mesenquimais osteoprogenitoras, se liga ao c-Fms (receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos) expresso em precursores de osteoclastos, induzindo proteínas sinalizadoras, principalmente Akt e ERK, que induzem a diferenciação de osteoclastos. O RANKL, expresso por osteoblastos, osteócitos, células estromais e fibroblastos, além de células inflamatórias^{9,40,41}, ativa fatores de transcrição como NF- κ B e fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) que induzem a expressão de marcadores osteoclastogênicos como a TRAP e a CatK (Catepsina K)^{19,26}. Em contrapartida, a osteoprotegerina (OPG), uma citocina da família do TNF secretada por osteoblastos e células epiteliais^{42,43} atua como um receptor *decoy* para RANKL, ocupando seu sítio de ligação e impedindo sua interação com o RANK, agindo como inibidor da osteoclastogênese⁴⁰. Uma vez que a indução de RANKL regula negativamente a indução da OPG⁴², estas citocinas devem ser analisadas em conjunto^{9,44}.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) são citocinas relevantes para a remodelação óssea, uma vez que a inibição das mesmas inibe marcadamente a reabsorção do tecido⁴⁵. O TNF induz a diferenciação de osteoclastos indiretamente, por meio da expressão de RANK e RANKL⁴⁶ e a IL-1 β

regula positivamente o RANKL⁴⁵. O TNF- α também exerce um efeito inibitório sobre a expressão de OSX, Runx-2 e ALPase em osteoblastos, mas depende de IL-1 β para induzir a função de osteoclastos⁴⁷. Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α são importantes para a sobrevivência de osteoclastos, a primeira por meio da ativação da via do NF- κ B, e o segundo por meio da redução da caspase-9, responsável pela ativação da caspase-3, uma caspase executora de apoptose⁴⁸⁻⁵⁰. Além disso, o TNF- α é capaz de inibir a diferenciação de osteoblastos, células importantes para a formação óssea⁵¹. Portanto, estes dados indicam que o TNF- α e a IL-1 β , conjuntamente, causam aumento na perda óssea, induzindo a atividade osteoclástica e inibindo a diferenciação osteoblástica.

O TNF- α secretado por macrófagos ativados e outros tipos celulares, particularmente em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, induz a formação de osteoclastos juntamente à IL-6⁵². O estímulo pode ocorrer também de forma autócrina, quando precursores de osteoclastos, sensibilizados pelo LPS bacteriano, sintetizam TNF- α que atua na própria célula (osteoclasto), potencializando os sinais pró-diferenciação^{53,54}. Há evidências de que a IL-1 (citocina pró-inflamatória) desempenha um importante papel na modulação da reabsorção óssea⁵⁵ e que, tanto a IL-1 α como a IL-1 β também atuam, negativamente, em processos envolvidos na formação óssea^{56,57}.

Estes mediadores constituem apenas parte da complexa cascata de citocinas envolvidas na progressão do processo inflamatório e são produzidos por diferentes células, dentre elas os macrófagos que constituem os fagócitos mononucleares⁵⁸. De maneira geral, os macrófagos são classificados em dois tipos, dependendo da forma de ativação e da função que desempenha no processo inflamatório: macrófagos M1 e M2. O M1 é ativado pela via clássica, por interferon- γ (IFN- γ), e está relacionado à fase inicial da inflamação, na qual possui papel fagocitário, enquanto o macrófago M2 é ativado por IL-4 e IL-13 (via alternativa) e está frequentemente associado às etapas finais de reparação dos tecidos, sendo que uma única célula pode alternar entre os dois tipos de macrófago⁵⁸. Há algumas evidências de que diferentes subpopulações de macrófagos possam interferir na biologia óssea. Estes macrófagos foram denominados “osteomacs”, identificados pela expressão de F4/80^{58,59}. Estudos sugerem que tanto o fenótipo M1 quanto o M2 aumentam num quadro de periodontite e são positivos para o F4/80⁶⁰. A depleção de “osteomacs” positivos ao F4/80, via

administração de lipossomas carregados com clodronato, causa redução da deposição de matriz óssea mineralizada, sugerindo que os “osteomacs” possuem influência na formação óssea *in vivo*⁶¹.

Considerando que o osso alveolar apresenta um alto índice de remodelação em virtude das forças mastigatórias exercidas sobre os dentes, além dos movimentos pós-eruptivos⁶², o periodonto, tanto em condições fisiológicas como patológicas, se constitui num bom modelo para o estudo da remodelação óssea e, mais particularmente, das células ósseas e mediadores envolvidos neste processo. A periodontite induzida em molares de ratos tem sido amplamente utilizada como um modelo para avaliar a efetividade de diferentes fármacos como possíveis terapias coadjuvantes ao tratamento periodontal básico, representado pela raspagem e alisamento radicular^{9,63-65}. Dessa maneira, o uso de alguns fármacos, antimicrobianos e anti-inflamatórios, têm sido propostos como terapia para modular a resposta do hospedeiro, visando amenizar a resposta inflamatória e a progressão da periodontite, complementando o tratamento periodontal básico⁶⁶. Outro ponto importante é que o uso de fármacos na periodontite induzida em animais constitui também uma possibilidade de avaliar a ação de algumas citocinas ou a deficiência destas sobre as células ósseas, contribuindo, pelo menos em parte, para a compreensão do seu papel na complexa cascata de eventos envolvidos na diferenciação, atividade e sobrevivências das células ósseas. Dentre os diversos fármacos que têm sido usados nos modelos experimentais de periodontite, a diacereína, um anti-inflamatório, tem sido estudado pelo nosso grupo de pesquisa e demonstraram que este fármaco promove redução significativa na reação inflamatória, na imunoexpressão de IL-1 β e de MMP-8⁶⁵, sugerindo, portanto, que deve interferir na atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos.

3.4 Diacereína

A diacereína, comercializada como “Artrodar®” (TRB Pharma, São Paulo - SP), é um medicamento desenvolvido para o tratamento de osteoartrite⁴, cujo metabólito ativo é a reína, um anti-inflamatório não esteroidal com ação antioxidante, metabolizada no fígado e filtrada nos rins⁶⁷. A diacereína é um medicamento derivado da antraquinona extraída do ruibarbo⁵ cujo efeito foi observado principalmente em

articulações, no tratamento de osteoartrite, atuando com moderado efeito anti-inflamatório e antipirético, além de efeitos antiartríticos⁶⁸⁻⁷⁰. Sugere-se que seu efeito seja tanto sobre a sintomatologia dolorosa da artrite quanto sobre a estrutura articular⁷¹, desde que o princípio ativo desta droga é capaz de inibir a síntese da IL-1 β por células sinoviais em pacientes com osteoartrite⁷². No tecido ósseo, a diacereína exerceu um efeito protetivo contra a reabsorção óssea, inibindo a diferenciação e sobrevivência de osteoclastos no osso subcondral⁷³. A diacereína apresentou eficácia semelhante a AINES como naproxeno e tenoxicam em pacientes com osteoartrite⁷⁴, porém não aumenta o risco de problemas renais e hepáticos como outros medicamentos anti-inflamatórios, o que lhe confere melhor risco-benefício⁷³. Em contrapartida, o tratamento com a diacereína foi relacionado a efeitos laxativos, causando diarreia leve e moderada, reversível após a interrupção do tratamento⁷³.

Estudos têm demonstrado que a diacereína possui potencial efeito anti-inflamatório por inibir a síntese e atividade de citocinas como IL-1, TNF- α , e IL-6 em monócitos de humanos^{69,70}. Quando a IL-1 β ativada se liga ao seu receptor (IL-1R) ocorre a degradação do inibidor de NF- κ B (I κ B- α), permitindo a migração do NF- κ B para o núcleo, onde atua como fator de transcrição de outras citocinas como TNF- α , pró-IL-1 β ⁷⁵, e contribui para a osteoclastogênese⁷⁶. A ação inibitória da diacereína sobre a IL-1 β é explicada por meio da redução do IL-1R⁴ e inibição da enzima ativadora de IL-1 (caspase-1)⁶⁸. Com a inibição de IL-1, não há degradação de I κ B- α e, conseqüentemente, não há translocação de NF- κ B para o núcleo, onde atuaria como um fator de transcrição essencial para transcrição de alguns fatores, entre eles o TNF- α , inibindo a síntese dos mesmos^{68,77,78}.

A respeito da dose de diacereína a ser administrada para estudos em ratos, o estudo de Tamura et al.⁷⁹ concluiu que a dose de 100mg/kg inibiu o aparecimento de edema, reduziu significativamente o inchaço e o nível sérico de sinalizadores inflamatórios, além de preservar a massa óssea do fêmur. Além disso, a diacereína administrada diariamente na dose de 100mg/kg em ratos com periodontite reduziu significativamente os níveis séricos de IL-1 β após 4 semanas ao início do tratamento⁴.

Diante destas considerações, levantou-se a hipótese de que a diacereína pode interferir nas citocinas envolvidas na periodontite, principalmente no que diz respeito à remodelação óssea, influenciando na formação e/ou na morte de osteoclastos, bem como na atividade de osteoblastos. Considerando que a periodontite induzida em

molares de ratos causa um aumento da reabsorção óssea pela ativação de osteoclastos, essa doença constitui um bom modelo para avaliar o papel das citocinas na biologia das células ósseas.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 108 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman), adultos, machos, com peso aproximado de 250 gramas, oriundos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos em temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (65-75%) controladas, com fotoperíodo das 7h às 19h (12h claro, 12h escuro) e sob regime hídrico e alimentar *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado a sua realização pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo CEUA nº 17/2018 e Processo CEUA nº 12/2020).

A periodontite foi induzida com inserção de uma ligadura (fio de algodão nº40) no colo cervical do primeiro molar superior direito⁶⁵. Os ratos foram anestesiados com 0,08 mL/100 g de cloridrato de cetamina a 10% (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda) adicionando-se cloridrato de xilazina a 2% (Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda) na dosagem de 0,04 mL/100 g por via intraperitonal, utilizando-se seringa de insulina. Os animais foram posicionados numa mesa cirúrgica com os incisivos superiores e inferiores presos a uma argola de aço inoxidável. A ligadura foi realizada no primeiro molar superior direito e mantida por 7 dias. Após este período, os animais foram anestesiados (conforme descrito acima) e a ligadura foi removida. Os animais foram pesados uma vez na semana, sempre no mesmo dia da semana, para ajustar a dose de diacereína.

No mesmo dia da remoção da ligadura, foi iniciado o tratamento com diacereína (Artrodar®, TRB Pharma, São Paulo – SP) ou solução fisiológica estéril (cloreto de sódio 0,9%). A diacereína foi administrada diariamente por gavagem, com seringa de 2 mL, na concentração de 100 mg/kg de peso corporal do animal, durante 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. A dose foi baseada em estudos que demonstraram efeito da diacereína sobre os níveis de IL-1 β e amenizando os efeitos deletérios oriundos da osteoartrite^{4,79}. A solução salina foi administrada por gavagem, no mesmo volume utilizado na aplicação da diacereína, durante 7, 15 e 30 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n = número de animais/grupo). Assim, a pesquisa foi desenvolvida com 3 grupos: grupo controle (periodonto saudável), GPD (periodontite tratado com diacereína) e GPS (periodontite tratado com solução salina).

A distribuição dos animais de acordo com os grupos e o número de amostras para cada metodologia estão descritas no Quadro 1.

- **GPD (n = 39)** → 6 animais por período (n total = 18) para microscopia de luz e imuno-histoquímicas), 3 animais por período para a microscopia eletrônica de transmissão (MET; n total = 9) e 4 animais por período (n total = 12) para análise de RT-PCR.
- **GPS (n = 39)** → 6 animais por período (n total = 18) para microscopia de luz e imuno-histoquímicas), 3 animais por período para a MET (n total = 9) e 4 animais por período (n total = 12) para análise de RT-PCR.
- **GC (n = 30)** → 6 animais por período (n total = 18) para microscopia de luz (análise morfológica e imuno-histoquímica – lado direito da maxila) e para MET (amostras do lado esquerdo) e 4 animais por período (n total = 12) para análise de RT-PCR.

Quadro 1- Descrição do número de animais por grupo em cada período e número de animais usados para cada metodologia de análise

Grupos/ Períodos	Metodologias			Animais/ Grupos
	ML	MET	RT-qPCR	
GC 7 dias	6*	3*	4	10
GPD 7 dias	6	3	4	13
GPS 7 dias	6	3	4	13
GC 15 dias	6*	3*	4	10
GPD 15 dias	6	3	4	13
GPS 15 dias	6	3	4	13
GC 30 dias	6*	3*	4	10
GPD 30 dias	6	3	4	13
GPS 30 dias	6	3	4	13
Total de animais			108	

ML: microscopia de luz; MET: microscopia eletrônica de transmissão; RT-qPCR: reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.

*Nos grupos controles, as 6 maxilas do lado direito foram processadas para ML e o lado esquerdo de 3 animais (do mesmo animal usado para ML) foi coletado para MET.

Fonte: Elaboração própria.

Após 24 horas da última aplicação de diacereína ou solução salina, a eutanásia dos animais foi realizada com sobredose (aproximadamente, 3 vezes a dose utilizada

para anestesia) de anestésico (cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2%) por via intraperitoneal. Fragmentos da maxila foram então removidos e, imediatamente, fixados.

4.1 Processamento Laboratorial para Microscopia de Luz

As maxilas de 6 ratos de cada grupo/período foram removidas e fixadas com formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 48 horas. Os espécimes foram descalcificados com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) à 7% contendo 0,5% de formaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH ajustado para 7,2. Os espécimes imersos na solução de EDTA foram submetidos à ação do micro-ondas de laboratório (Pelco BioWave® Pro; Pelco Corporation, Clovis, CA, Estados Unidos) com potência ajustada para 300 W e temperatura máxima de 28°C. No total, foram realizados aproximadamente de 35 a 40 ciclos de 1 hora cada, sendo que a solução de EDTA foi trocada após 8 ciclos. Após a descalcificação, os espécimes foram desidratados em banhos crescentes de soluções de etanol a partir da concentração de 70°GL até o etanol absoluto. Subsequentemente, os espécimes foram diafanizados em 3 banhos de xilol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil), com duração de aproximadamente 8 horas. Em seguida, os espécimes foram mergulhados em 3 banhos de parafina líquida (58-60 °C), sendo que após a imersão na 4ª troca de parafina líquida os espécimes foram incluídos em parafina. Os espécimes foram posicionados de modo a obter cortes sagitais seriados com espessura de 6 µm da maxila contendo os 1º e 2º molares.

Em cada espécime, 3 cortes não seriados (com distância mínima entre eles de 100 µm) foram corados com tricrômico de Gomori para análise morfológica. Cortes aderidos em lâminas silanizadas foram submetidos às reações imuno-histoquímicas (anti-fosfatase alcalina, anti-F4/80) e imunofluorescência (anti-caspase-3); outros cortes foram submetidos ao método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling), para detecção de morte celular. Após a reação do TUNEL, os cortes foram submetidos à reação histoquímica para detecção da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), usada para marcar osteoclastos.

4.2 Imuno-Histoquímica Anti-F4/80

Para detecção de fagócitos mononucleares na lâmina própria (tecido conjuntivo subepitelial) da mucosa gengival foi utilizado o anticorpo anti-F4/80 (rabbit monoclonal anti-F4/80 antibody, Abcam, Cambridge Science, UK; cód: ab300421). Após a desparafinização e hidratação dos cortes, a recuperação antigênica foi realizada com tampão tris-EDTA (pH = 9,0) aquecido no micro-ondas durante 30 minutos. Após o bloqueio da peroxidase com a imersão das lâminas em H₂O₂ a 5% por 20 minutos a temperatura ambiente, os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e incubados com BSA 2% (Albumina sérica bovina; Sigma - Aldrich Co.) por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente para evitar reações inespecíficas. Em seguida os cortes foram incubados em câmara úmida *overnight* (16-18h) a 4°C com anticorpo primário anti-F4/80 (rabbit monoclonal anti-F4/80 antibody, Abcam) diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH = 7,0) na proporção de 1:500. Após a lavagem, os cortes foram incubados utilizando o Kit da *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* (VECTASTAIN® Elite® ABC Universal PLUS Kit Peroxidase Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG, Vector Laboratories, Newark, CA). Primeiramente, os cortes foram incubados com o complexo IgG biotinilado durante 40 minutos. Subsequente às lavagens, os cortes foram incubados com o complexo avidina/biotina por 40 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados, e a imunomarcagem foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Dako North America, Inc. Carpinteria, CA, USA; ref: K3468) na diluição de 10:1000, por 3-5 minutos e contracorados com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, cortes foram incubados com soro não imune.

O número de células imunopositivas ao F4/80 (em castanho) foi computado na lâmina própria da mucosa gengival interproximal (entre o primeiro e segundo molares). Em cada espécime, 3 campos (cada campo contendo 0,0145 mm²) foram capturados da lâmina própria da mucosa gengival usando a objetiva de 100x, conforme metodologia descrita previamente⁵. Com auxílio de um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão), o número de células imunopositivas em cada área foi obtido.

4.3 Imuno-Histoquímica Anti-Fosfatase Alcalina

Para avaliar se a diacereína tem algum papel na diferenciação e atividade de osteoblastos, foi utilizado o anticorpo anti-fosfatase alcalina (ALPase) produzido em coelho (Rabbit alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA; sc30203). Para a recuperação antigênica, os cortes desparafinizados foram tratados com uma solução de 200 µl de tripsina (5mg/ml) com 200 µl cloreto de cálcio (10mg/ml) e 1600 µl de água destilada, aquecida a 37°C durante 30 minutos. Após o bloqueio da peroxidase com H₂O₂ a 5%, os cortes foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e incubados com BSA 2% (Sigma- Aldrich Co.) por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente para impedir reações inespecíficas com o anticorpo primário. Os cortes foram incubados *overnight* (16-18h) com o anticorpo anti-fosfatase alcalina diluído na proporção de 1:100 numa câmara úmida a 4°C. No segundo dia, após a lavagem, os cortes foram incubados com as soluções do Kit da Dako EnVision Dual Link System-HRP (Dako North America) e a atividade da peroxidase foi revelada com o DAB, conforme descrito acima. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, os cortes foram incubados com soro não imune.

O número de osteoblastos ALPase-positivos (em castanho) na superfície do processo alveolar inter-radicular (entre as raízes do primeiro molar). Inicialmente, imagens do processo alveolar de cortes submetidos à detecção de ALPase foram capturadas com um microscópio de luz (BX-51; Olympus) usando a objetiva de 4x (aumento final de 65x). A superfície óssea linear do processo alveolar inter-radicular foi delimitada com o software de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0; Olympus) e, conseqüentemente, foi obtido a extensão desta superfície. Esta superfície mensurada foi observada ao microscópio (com a objetiva de 40x) e o número de osteoblastos imunopositivos foi computado. Dessa maneira, o número de osteoblastos ALPase-positivos por milímetro de superfície linear do processo alveolar foi obtido em cada espécime, estabelecendo-se uma média para cada grupo por período.

4.4 Reação do TUNEL

Os cortes foram submetidos ao método do TUNEL utilizando o kit ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection (Temecula, CA, USA). Após a desparafinização e hidratação, foi realizada a incubação dos cortes em câmara úmida com 20 µg/ml de proteinase K (Sigma-Aldrich, Alemanha) diluída em PBS durante 15 minutos a 35°C. Após o bloqueio da peroxidase com H₂O₂ a 5% durante 20 minutos, os cortes foram incubados com o 50 µl de tampão de equilíbrio (fornecido pelo Kit) em câmara úmida à temperatura ambiente. Após 10 minutos, os cortes foram incubados por 1 hora a 35°C com tampão de reação, TdT e água destilada, de acordo com o *datasheet* fornecido pelo fabricante. As lâminas então foram mergulhadas em solução de *stop wash* (fornecido pelo Kit) por 10 minutos e, em seguida, foram submetidas a lavagem em água corrente, água destilada e PBS 0,01 M (pH 7,2). Finalmente, os cortes foram incubados com anti-digoxigenina por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação da peroxidase foi revelada com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Dako North America) por 3 minutos e os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi. Como controle positivo foram utilizados cortes de glândula mamária em involução (fornecidos pelo fabricante do Kit); no controle negativo, os cortes foram submetidos ao mesmo procedimento, porém a enzima "TdT" foi substituída por água destilada.

Em cada espécime, foram analisados, no mínimo, 2 cortes não seriados submetidos à reação do TUNEL. A frequência de osteoclastos TUNEL-positivos foi estimada em todos os espécimes de todos os grupos e períodos (n = 6 por grupo/período). Com auxílio do microscópio BX-51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram computados aproximadamente 25 osteoclastos contendo 2 ou mais núcleos e que estavam justapostos à superfície do processo alveolar ao redor do 1º molar. A partir destes 25 osteoclastos de cada espécime, o número de osteoclastos exibindo pelo menos 1 núcleo TUNEL-positivo (núcleo em castanho) foi computado. Subsequentemente, o percentual de osteoclastos positivos foi calculado, obtendo-se assim a frequência de osteoclastos TUNEL-positivos em cada espécime.

Após a reação do TUNEL, os cortes foram submetidos ao método do TRAP, seguindo a metodologia previamente padronizada⁸⁰. O método do TRAP seguido a reação do TUNEL foi realizado para confirmar a identificação de osteoclastos⁸⁰.

Brevemente, após a incubação com anti-digoxigenina por 30 minutos e lavagem em água destilada, os cortes foram incubados numa solução de 50 mL de acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0) onde foi dissolvido 70 mg de *Fast Red Salt TR* (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). A esta solução foram adicionado 8 mg de naftol AS-BI fosfato (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) previamente dissolvido em 500 µl de N-N-dimetilformamida. Subsequentemente, 50 mM de tartarato de sódio foram adicionado à solução e, finalmente, a solução foi filtrada. Os cortes foram incubados neste meio a 37°C por aproximadamente 4 horas. Em seguida, os cortes foram lavados, corados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio aquoso. A reação do TRAP subsequente ao método do TUNEL foi realizada nos cortes com a finalidade de ilustrar os resultados.

4.5 Imunofluorescência para Detecção da Caspase-3

Considerando que o método do TUNEL isoladamente não pode ser utilizado para caracterizar apoptose⁸¹⁻⁸⁴, foi adicionado no estudo a detecção da caspase-3. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram submersos em 0,001 M citrato de sódio (pH=6,0) que foi aquecido a 98° C no micro-ondas por 30 min, para recuperação antigênica. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os cortes foram lavados em tampão PBS, incubados com BSA 2% e, subsequentemente no anticorpo primário produzido em coelho anti-caspase-3 (Abcam, cód. ab 4051), na diluição de 1:100 em um meio preparado com PBS/BSA 2% na proporção 1:1. A incubação ocorreu em câmara úmida a 4°C por 16-18 horas. Após a lavagem em tampão PBS, os cortes foram então incubados por 1 hora no anticorpo secundário conjugado com fluorocromo anti-coelho produzido em cabra (Alexa Fluor® 488 Abcam) na diluição 1:1000. Subsequentemente às lavagens em PBS, foi realizada a coloração nuclear por 5 minutos com o DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™, Invitrogen), na proporção 2:1000 em PBS. Finalmente, as lâminas foram montadas com o meio aquoso (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako). Como controle negativo, os cortes foram incubados com soro não imune em substituição a incubação com o anticorpo primário; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação. As imagens de osteoclastos exibindo citoplasma imunofluorescente foram capturadas com a objetiva de 40x usando a câmera DFC 550 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplada

a um microscópio de fluorescência (BM4000 B LED, Leica Microsystems, Alemanha). Considerando que a frequência de osteoclastos TUNEL-positivos foi estimada, as reações para detecção de caspase-3 foram realizadas apenas para confirmar o processo de morte por apoptose (e não necrose) dos osteoclastos.

4.6 Processamento Laboratorial para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise ultraestrutural foram coletados 3 espécimes de cada grupo por período. Os fragmentos de maxila contendo a região interproximal (entre os 1º e 2º molares) foram coletados e fixados em solução contendo 4% de glutaraldeído e 4% de formaldeído (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 48 horas a temperatura ambiente. Os fragmentos de maxila foram descalcificados em solução de EDTA 7% tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M contendo 0,5% de formaldeído em pH 7,2 por, aproximadamente, 40 dias. Após a descalcificação, os fragmentos foram reduzidos, pós-fixados durante 1 hora com tetróxido de ósmio à 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após lavagens em água destilada, os fragmentos foram contrastados *en bloc* com acetato de uranila a 2% durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens em água destilada, os fragmentos foram desidratados, tratados com óxido de propileno e, em seguida, procedeu-se a infiltração do material, iniciando-se com uma mistura de óxido de propileno/Araldite na proporção de 1:1 onde permaneceu *overnight*. Então os espécimes foram infiltrados em resina pura, por aproximadamente 72 horas, com 3 trocas; Os espécimes foram incluídos em moldes de silicone e a polimerização ocorreu em estufa a 56°C durante 72 horas. Os blocos foram aparados e os cortes semifinos corados com azul de toluidina a 1% contendo 1% de borato de sódio foram observados para seleção das áreas de interesse (áreas do osso alveolar contendo osteoclastos) para a ultramicrotomia. Cortes ultrafinos foram obtidos com o ultramicrotomo (Ultracut UCT, Leica, Alemanha), coletados com tela de cobre. Após os cortes serem contratados com 1% de acetato de uranila em etanol 70° GL e citrato de chumbo, os espécimes foram analisados e capturados em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2 Spirit, FEI Company) do Instituto de Ciências Biológicas de Botucatu (UNESP).

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR)

Após a coleta, as amostras de mucosa gengival foram imediatamente imersas em solução de RNA Keeper (LGC Biotecnologia: Cotia, Brasil) e armazenadas a -20°C. Após 24 horas, a solução de RNA keeper foi descartada e as amostras armazenadas a -80°C. Para a extração do RNA foi utilizado o kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, USA) e a transcrição reversa foi realizada usando o Kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). Foram utilizados o PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) como marcador e o sistema QuantStudio 3 (Applied Biosystems) para análise do qPCR em tempo real. Previamente foram escolhidos os primers para análise dos genes alvo de rato, cujas sequências estão descritas na Tabela 1. Os genes escolhidos foram: *Tnf* e *Il1b* (TNF- α e IL-1 β) por serem alvos primários da diacereína e *Tnfsf11* e *Tnfrsf11b* (RANKL e OPG) que possuem influência na formação e ativação de osteoclastos, além da β -Actina para controle endógeno e normalização. O PCR em tempo real foi conduzido em duplicata para cada amostra e gene, e a expressão foi determinada pelo método $\Delta\Delta CT$ e testes T entre os grupos.

Tabela 1 – Primers utilizados para RT-qPCR

Gene alvo	gene nº NCBI	nº de bases	sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Tm °C
β -Actina (Sigma Aldrich, EUA)	NM_031144.3	20	(F) ACGGTCAGGTCATCACTATC	59
		19	(R) TGCCACAGGATTCCATACC	63.4
<i>Tnf</i> (Exxtend, Brasil)	NM_012675.3	20	(F) CTCCAAAGTAGACCTGCCCCG	60
		20	(R) AGAGCGGTGATTCAAAGGCA	55
<i>Il1b</i> (Exxtend, Brasil)	NM_031512.2	20	(F) AACAGCAATGGTCGGGACAT	55
		20	(R) TTGACCAGAATGTGCCACGG	57
<i>Tnfsf11</i> (Exxtend, Brasil)	NM_057149.1	20	(F) CTTGGGATTTTGATGCTGGT	53
		20	(R) TCGGGTTCCCATAAAGTCAG	55
<i>Tnfrsf11b</i> (Exxtend, Brasil)	NM_012870.2	20	(F) CCTCTTTCTCAGGGTGCTTG	57
		20	(R) GAATGGTCACTGGGCTGTTT	55

Fonte: Elaboração própria.

4.8 Análise Estatística

Os dados quantitativos referentes às reações imuno-histoquímicas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. A análise de expressão gênica foi realizada através do método $\Delta\Delta CT$ para quantificação relativa e análise de variância de um fator (one-way ANOVA) com pós-teste de Tukey para os genes de *Tnf* e *Il1b* (TNF- α e IL-1 β), e two-way ANOVA para análise da razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG), também com pós-teste de Tukey. A significância considerada foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados do trabalho foram subdivididos de acordo com a metodologia de análise.

5.1 Análise Morfológica

A coloração com tricrômico de Gomori evidenciou a desorganização do periodonto nos grupos GPD (Figuras 1D-1F) e GPS (Figuras 1G-1I), tanto em relação à mucosa gengival quanto o tecido ósseo, em contraste com os espécimes do GC (Figuras 1A-1C). No GC, a porção mais apical do epitélio juncional estava situada na junção cimento-esmalte e o processo alveolar se projetava pouco aquém da junção cimento-esmalte, recoberto invariavelmente pelo grupo de fibras colágenas interdentárias (Figuras 1A-1C). Nos espécimes do GPD e GPS, a papila interdentária não exibia o típico formato filiforme (Figuras 1E-1H) apresentando-se com aspecto ulcerado; o epitélio juncional estava adjacente à superfície do cimento, apicalmente à junção cimento-esmalte (Figuras 1D-1I). Nos grupos GPD e GPS, a lâmina própria (tecido conjuntivo subjacente ao epitélio) da mucosa gengival continha marcante presença de células inflamatórias em comparação aos espécimes do GC. Além disso, nos espécimes do GPD e GPS havia a presença de diversas papilas conjuntivas na interface entre o epitélio e a lâmina própria. Nos molares com periodontite (GPD e GPS), os grupos de fibras interdentárias estavam inseridas no cimento, porém distante da junção cimento-esmalte (Figuras 1D-1I) em comparação ao nível de inserção nos animais do GC (Figuras 1A-1C). Evidente perda na altura do processo alveolar foi também observada nos animais dos grupos GPD (Figuras 1D-1F) e GPS (Figuras 1G-1I).

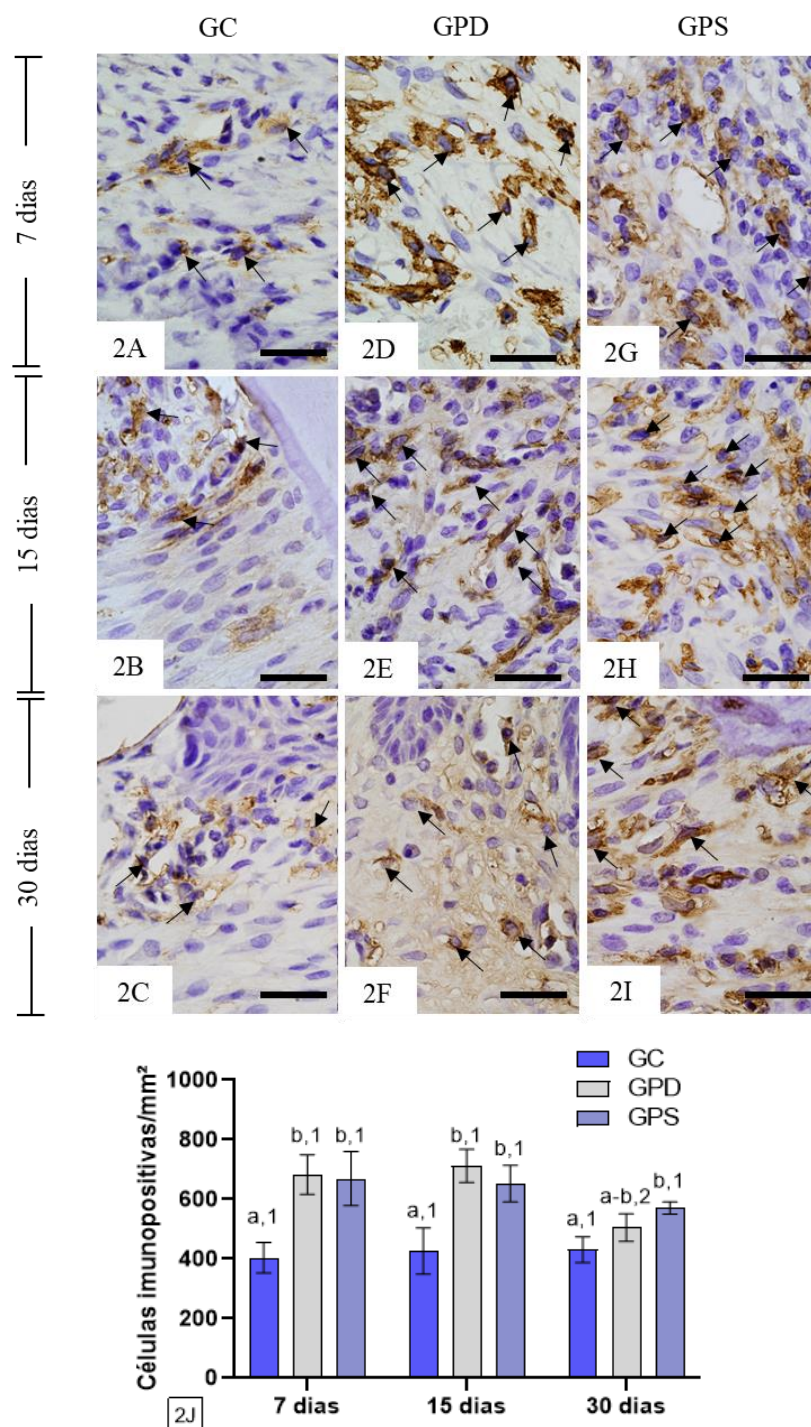
Figura 1A-1I: Fotomicrografias de cortes sagitais de maxila de ratos mostrando porções da região entre o primeiro (1M) e segundo (2M) molares. **1A-1C.** Grupo controle (GC) evidenciando periodonto saudável: porção mais apical do epitélio juncional (EJ) coincidente com a junção cimento-esmalte (JCE), mucosa gengival (MG) com aspecto filiforme, grupo de fibras interdentárias (FI) inseridas no cimento imediatamente subjacente ao término do epitélio juncional (EJ) e processo alveolar (PA) recoberto pelas fibras interdentárias. **1D-1I.** Grupos GPD e GPS – término do epitélio juncional (EJ) é observado aquém da junção cimento-esmalte (JCE), ausência do formato filiforme da mucosa gengival (MG), mucosa gengival (MG) exibe epitélio espesso (em vermelho), interface epitélio/lâmina própria da MG com profundas papilas conjuntivas (setas), além das fibras interdentárias (FI) inseridas na superfície da raiz, distante da junção cimento-esmalte (JCE). LP, ligamento periodontal. Tricrômico de Gomori. Barras: 182 µm.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.2 Imuno-Histoquímica Anti-F4/80

Os cortes submetidos a detecção imuno-histoquímica anti-F4/80 revelaram imunomarcacão (em castanho) no citoplasma de células com núcleos elípticos ou irregulares na lâmina própria da mucosa gengival dos espécimes de todos os grupos e diferentes períodos (Figuras 2A-2I). No entanto, acentuada imunomarcacão foi observada frequentemente nos espécimes dos grupos GPD (Figuras 2D-2F) e GPS (Figuras 2G-2I) em comparação aos do GC (Figuras 2A-2C).

A análise quantitativa (Figura 2J) revelou discreta imunomarcacão na lâmina própria dos espécimes do grupo GC em todos os períodos; além disso, o número de células imunopositivas no GC não variou significativamente com o decorrer do tempo. Em todos os períodos, o número de células imunomarcadas foi significativamente maior nos espécimes do GPS em comparação ao GC (7 dias: $p < 0,0001$; 15 dias: $p < 0,0001$; 30 dias: $p = 0,0326$) enquanto diferenças significantes não foram observadas entre GPS e GPD (7 dias: $p > 0,9999$; 15 dias: $p = 0,8443$; 30 dias: $p = 0,7162$). Embora aos 7 e 15 dias a imunoexpressão tenha sido significativamente maior no GPD em comparação ao GC ($p < 0,0001$), não foi detectada nenhuma diferença significativa entre estes dois grupos aos 30 dias ($p = 0,6555$). De 7 para 15 dias, o número de células imunomarcadas não apresentou diferenças significantes nos grupos GPD ($p = 0,9980$) e GPS ($p > 0,9999$). Porém de 15 para 30 dias uma redução significativa foi observada no GPD ($p = 0,0001$) enquanto no GPS, nenhuma diferença significativa foi detectada ($p = 0,5279$).

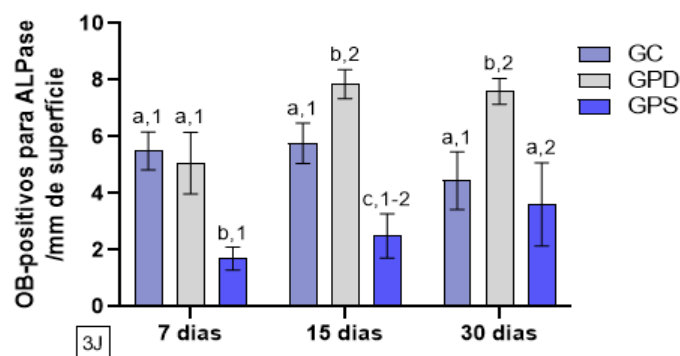
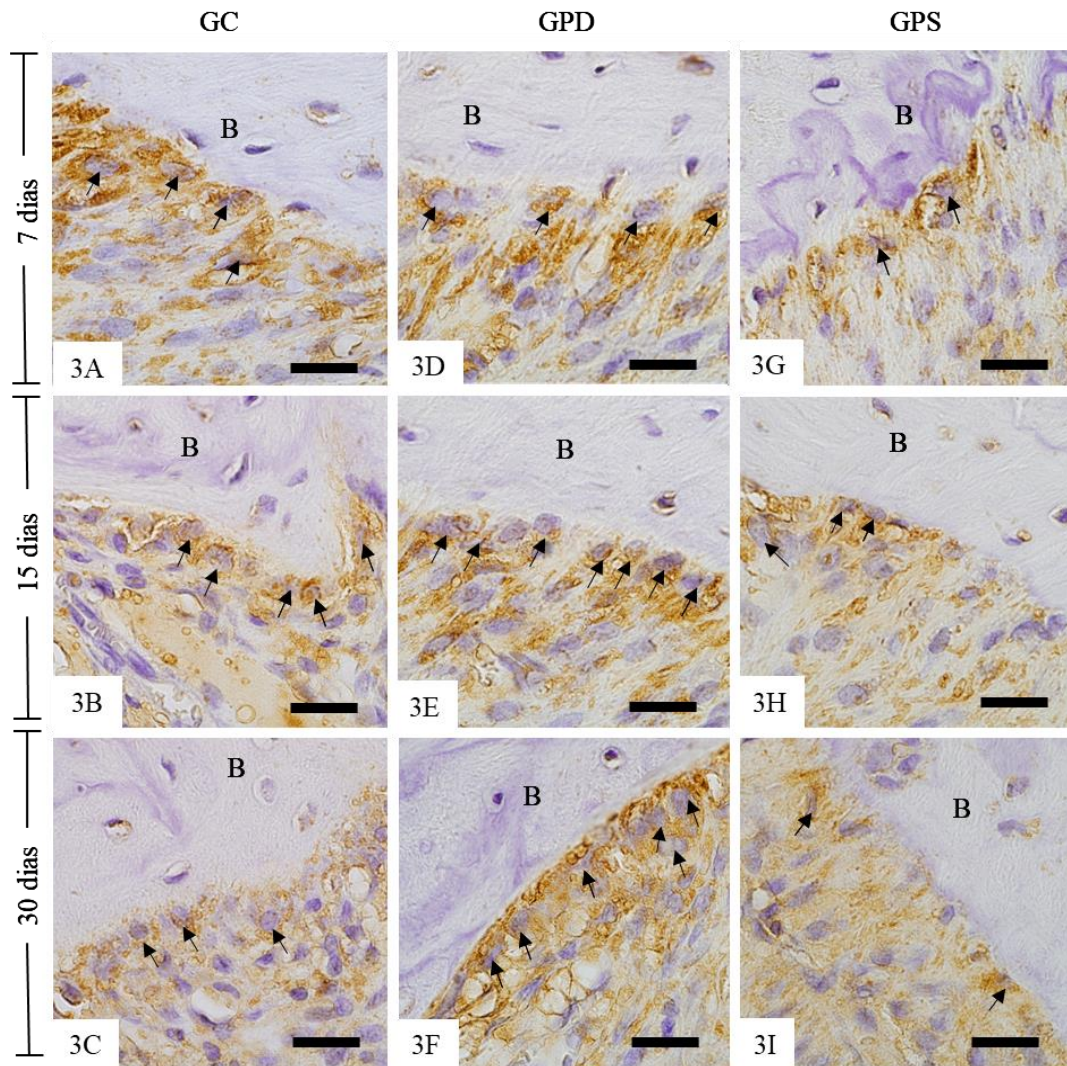
Figura 2 - Fotomicrografias mostrando a imunomarcagem para F4/80

Figuras 2A-2I: Fotomicrografias mostrando porções da lâmina própria da mucosa gengival de molares de ratos dos grupos GC, GPD e GPS aos 7, 15 e 30 dias. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de fagócitos mononucleares F4/80+ (em castanho) e contracolorados com hematoxilina de Carazzi. No GC (Figuras 2A-2C), poucas células imunopositivas ao F4/80 (setas) em comparação aos grupos GPD (Figuras 2D-2F) e GPS (Figuras 2G-2I). Barras: 13 μ m. **Figura 2J:** Gráfico de barras mostrando os valores (média $\pm$ desvio padrão) de células imunopositivas para F4/80 na lâmina própria da mucosa gengival dos grupos dos GC, GPD e GPS aos 7, 15 e 30 dias de tratamento. A comparação entre os grupos está indicada por letras minúsculas e entre os períodos, por números; letras e números diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos e períodos, respectivamente (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal da autora

5.3 Imuno-Histoquímica Anti-Fosfatase Alcalina

A detecção de fosfatase alcalina (ALPase) revelou, em todos os grupos, células adjacentes à superfície óssea com citoplasma acastanhado, indicando positividade para a reação imuno-histoquímica (Figuras 3A-3I). De acordo com a Figura 3J, o número de osteoblastos exibindo positividade à ALPase nos espécimes do GPD foi significativamente maior em comparação aos espécimes do GPS ($p < 0,0001$), em todos os períodos. Embora aos 7 dias nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada entre os espécimes dos grupos GC e GPD ($p = 0,9948$), o número de osteoblastos positivos para ALPase no GPD foi significativamente maior em comparação aos espécimes do GC aos 15 ($p = 0,0032$) e aos 30 ($p < 0,0001$) dias. Em contraste, o GPS apresentou valores significativamente menores em comparação ao GC aos 7 ($p < 0,0001$) e 15 ($p < 0,0001$) dias enquanto, aos 30 dias, não houve diferença significativa entre os grupos GPS e GC ($p = 0,8300$).

Figura 3 - Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para fosfatase alcalina

Figuras 3A-3I: Fotomicrografias da superfície óssea ao redor das raízes do primeiro molar de ratos dos grupos GC, GPD e GPS nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de ALPase (em castanho) e contracolorados com hematoxilina de Carazzi. Osteoblastos (setas) exibindo citoplasma positivo à ALPase (em castanho) estão na superfície do processo alveolar (B). Barras: 13 µm.

Figura 3J: Gráfico mostrando os valores (média ± desvio padrão) de células imunopositivas para ALPase nos grupos dos GC, GPD e GPS aos 7, 15 e 30 dias. A comparação entre os grupos está indicada por letras e entre os períodos, por números; letras e números diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos e períodos, respectivamente (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal da autora

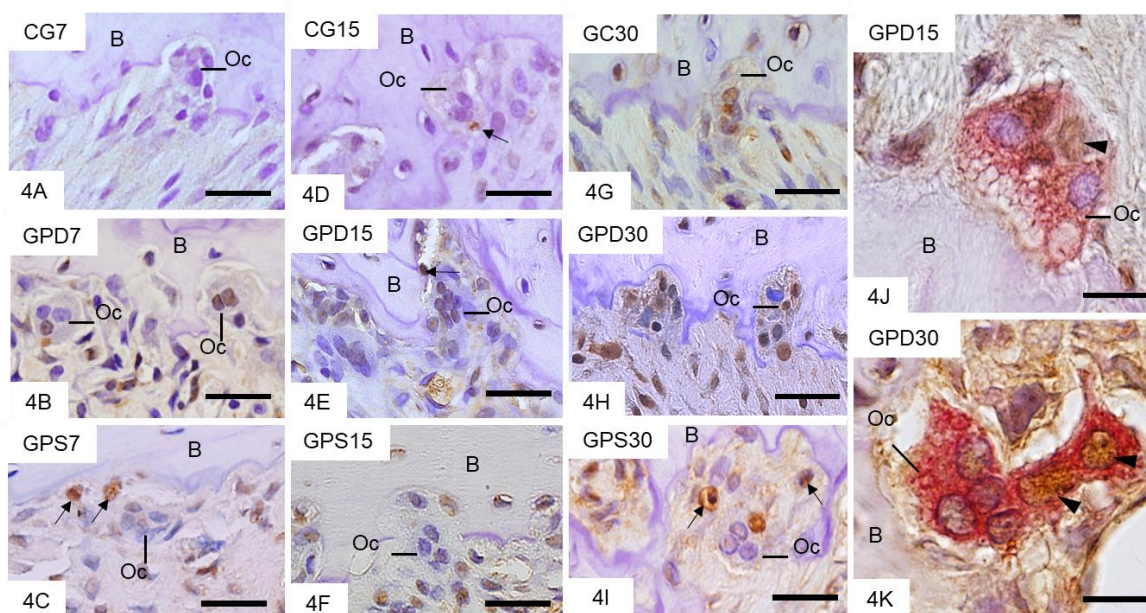
5.4 Osteoclastos TUNEL/TRAP-Positivos, Imunoexpressão de Caspase-3 e Análise Ultraestrutural

Osteoclastos, células multinucleadas adjacentes à superfície óssea, exibindo um ou mais núcleos positivos ao método do TUNEL (em castanho), foram observados no periodonto dos animais do GPD (Figuras 4B, 4E e 4H) e GPS (Figura 4I) bem como no GC (Figura 4G). Estruturas arredondadas/ovoides exibindo positividade ao TUNEL foram também observadas próximas à superfície óssea (Figuras 4C, 4D, 4E e 4I). Os cortes submetidos ao método do TUNEL e, em seguida ao TRAP, mostraram osteoclastos com atividade positiva à fosfatase ácida resistente ao tartarato revelado pelo citoplasma em vermelho contendo núcleos TUNEL-positivos (Figuras 4J e 4K). Os cortes de glândula mamária usados como controle positivo apresentaram diversas células com núcleos em castanho (TUNEL-positivos) enquanto nenhuma marcação foi observada nos cortes usados como controle negativo (dados não ilustrados).

Como mostrado na figura 5, a frequência de osteoclastos exibindo positividade ao método do TUNEL foi significativamente maior no GPD ($p < 0,0001$) em comparação aos grupos GPS e GC, em todos os períodos. Em contraposição, diferenças significantes não foram observadas entre o GPS e GC aos 7 ($p = 0,6351$), 15 ($p > 0,9999$) e 30 ($p = 0,3176$) dias. De 7 para 30 dias, não houve diferença significativa nos espécimes do GPD ($p = 0,6091$) enquanto, no GPS, um significativo aumento na frequência de osteoclastos TUNEL-positivos foi observado ($p = 0,0053$). No GC, diferenças significantes não foram detectadas na frequência de osteoclastos TUNEL-positivos entre os períodos ($p \geq 0,9988$).

Nos 3 grupos, osteoclastos exibindo citoplasma positivo à caspase-3 (em verde) foram observados em todos os períodos (Figuras 6A-6I). No entanto, no GPD (Figuras 6D-6F) osteoclastos exibiram áreas citoplasmáticas fortemente positivas à caspase-3 em comparação aos grupos GPS (Figuras 6G-6I) e GC (Figuras 6A-6C).

Figura 4 - Fotomicrografias mostrando a reação do TUNEL



Figuras 4A-4I: Fotomicrografias de cortes sagitais dos grupos GC, GPD e GPS nos períodos de 7, 15 e 30 dias submetidos ao método de TUNEL (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. Em todos os grupos, alguns osteoclastos (Oc) exibindo núcleos TUNEL-positivos (Figuras 4B, 4E, 4G, 4H e 4I) são observados na superfície óssea (B). Estruturas TUNEL-positivas (asteriscos) justapostas à osteoclastos (Oc) são observadas no GC (Figura 4D), GPS (Figuras 4C e 4I) e GPD (Figura 4E). Note que osteoclastos (Oc) com núcleos TUNEL-negativos são observados em todos os grupos (Figuras 4A, 4C, 4E, 4F). Barras: 43 µm. **Figuras 4J e 4K:** Fotomicrografias de cortes sagitais de maxila do GPD submetidos ao método do TUNEL (em castanho) e, subsequentemente, a reação da TRAP (em vermelho). Osteoclastos (Oc) exibindo forte positividade citoplasmática à fosfatase ácida resistente ao tartarato (em vermelho) apresentam alguns núcleos TUNEL-positivos (cabeças de seta). Barras: 10 µm.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 5 – Frequência de osteoclastos TUNEL-positivos

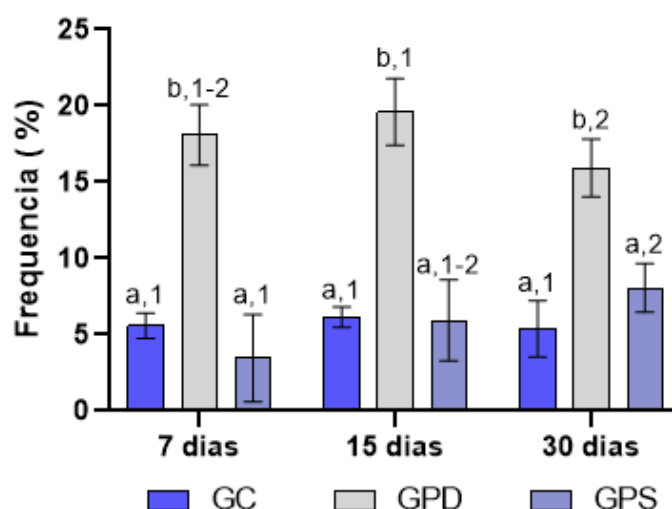
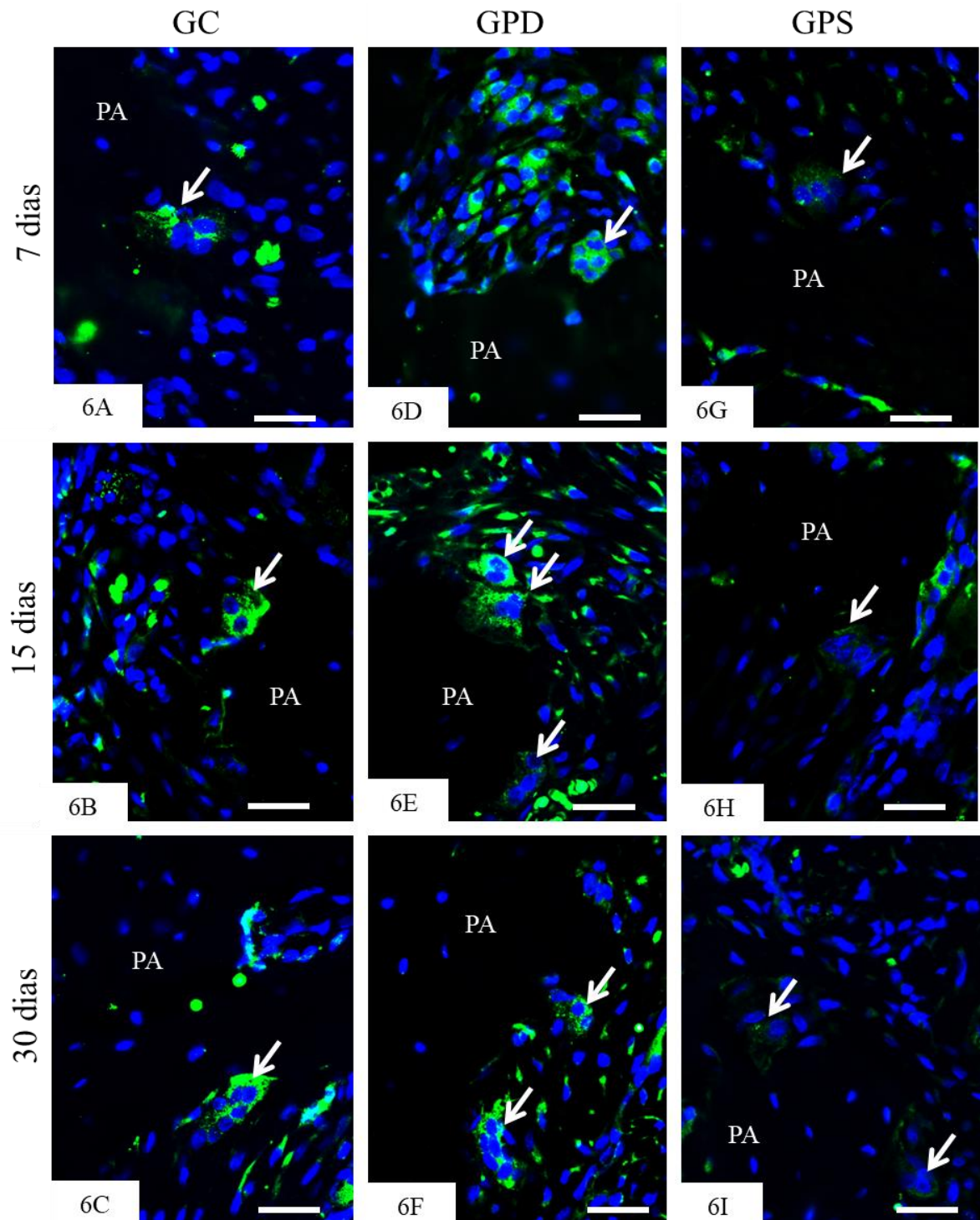


Figura 5: Gráfico ilustrando os valores (média ± desvio padrão) da frequência de osteoclastos TUNEL-positivos nos grupos GC, GPD e GPS nos períodos de 7, 15 e 30 dias. A comparação entre os grupos é indicada por letras e, entre os períodos, indicada por números; letras e números diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos e períodos, respectivamente (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 6 - Fotomicrografias mostrando a imunofluorescência para caspase-3

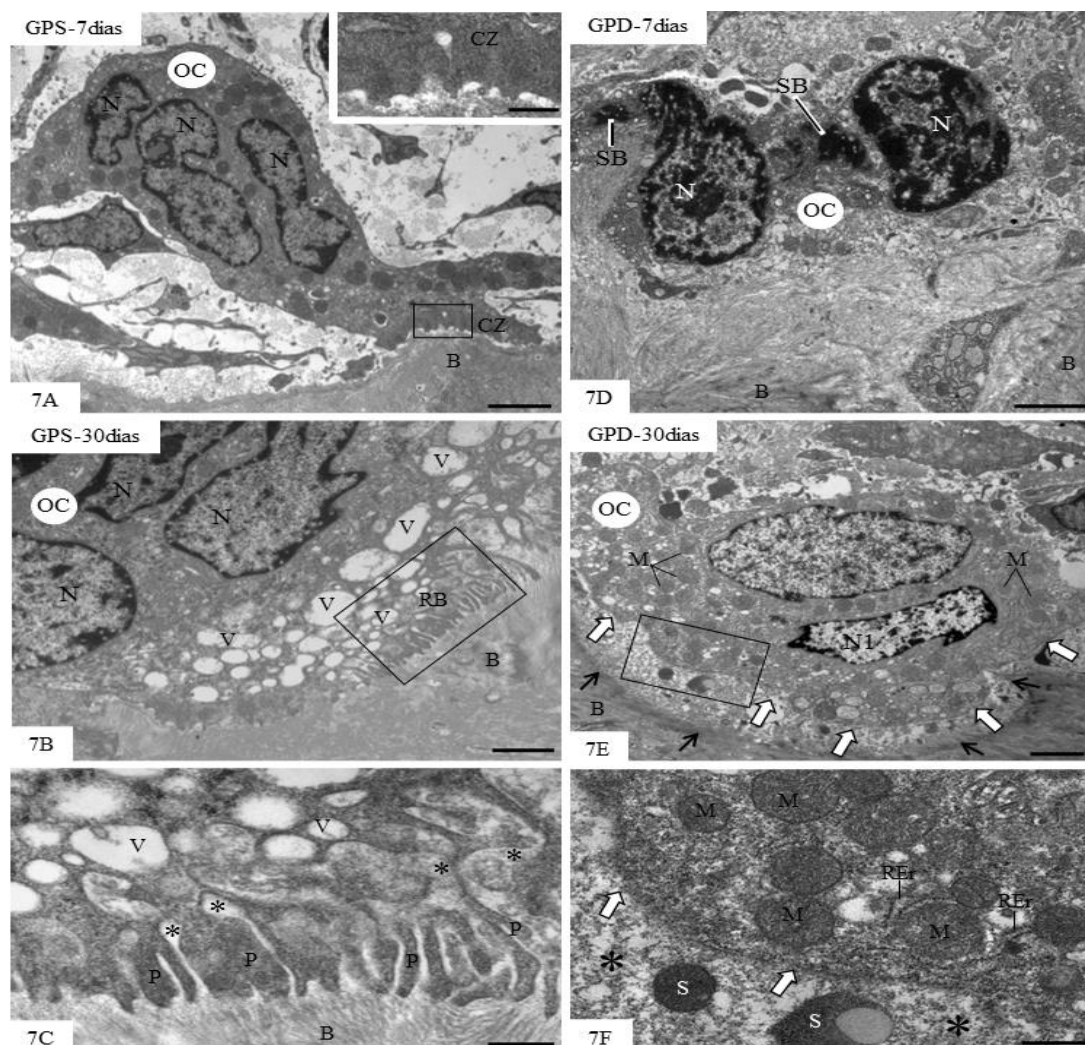


Figuras 6A-6I: Fotomicrografias mostrando porções do processo alveolar dos grupos GC, GPD e GPS. Os cortes foram submetidos à imunofluorescência para detecção da caspase-3 (em verde) e marcação nuclear com DAPI. No grupo GPD, alguns osteoclastos exibem forte positividade à reação (setas). PA, processo alveolar; VS, vaso sanguíneo. Barras: 18 μ m.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

A análise ultraestrutural revelou a presença de osteoclastos exibindo zona clara e borda em escova com profundas invaginações entre as finas projeções citoplasmáticas (Figuras 7B e 7C) no osso alveolar de todos os grupos. Em contraste, osteoclastos mostrando núcleos com conspícuas massas de cromatina elétron-opaca (Figura 7D) ou cromatina periférica condensada (Figura 7E) foram frequentemente observados nos espécimes do GPD; borda em escova e zona clara não foram observadas nestes osteoclastos alterados (Figuras 7D- 7F). Os osteoclastos alterados estavam situados próximos à superfície óssea entre osteoblastos e osteoclastos com aspecto aparentemente normal.

Figura 7 – Eletromicrografias mostrando osteoclastos



Figuras 7A-7F: Eletromicrografias do osso alveolar (B) mostrando osteoclastos (OC) dos grupos GPS (7A-7C) e GPD (7D-7F). Em GPS, osteoclastos multinucleados (Figuras 7A e 7B) estão justapostos às superfícies escavadas do osso alveolar (B). Em **7A**, um osteoclasto (OC) mostra uma porção da zona clara (CZ) em íntima justaposição à superfície do osso alveolar (B). O *inset*, área delimitada em 7A, mostra os numerosos microfilamentos tipicamente observados na zona clara (CZ). N, núcleo. Barras: 5 µm e 1 µm (*inset*). Em **7B**, uma porção de osteoclasto (OC) exibindo borda em escova (RB) intimamente justaposta à superfície óssea (B) em reabsorção. Vários vacúolos (V) com variadas formas e tamanho estão situados próximos à borda em escova (RB). N, núcleo. Barra: 3,5 µm. **Figura 7C:** área delimitada na Figura 7B, mostra numerosas projeções citoplasmáticas (P) e profundas invaginações da membrana (asteriscos) da borda em escova (RB). Barra: 1 µm. **Figura 7D:** um osteoclasto (OC) apresenta núcleos (N) com massas irregulares de cromatina condensada. Pequenos corpos (SB) exibindo cromatina condensada, localizados próximos aos núcleos (N), são também observados no osteoclasto (OC). Barra: 5 µm. Na **Figura 7E**, um osteoclasto (OC) contendo um núcleo (N1) com cromatina periférica condensada está situado numa profunda área escavada (setas finas) da superfície do osso alveolar (B). Na superfície apical do osteoclasto (OC), a membrana plasmática próxima à superfície óssea (B) apresenta-se quase completamente contínua/lisa (setas grossas), além da presença de diversas mitocôndrias (M). Barra: 5 µm. **Figura 7F:** área delimitada em 7D em maior aumento. Porção apical do citoplasma do osteoclasto, adjacente à superfície óssea (B), contém diversas mitocôndrias (M) e mostra a sua membrana plasmática quase que completamente contínua/lisa (setas grossas) em comparação à Figura 7C; projeções citoplasmáticas ou zona clara não são observadas. Um material amorfo de aspecto granular (asteriscos) e estruturas elétron-opacas (S) são observadas entre as superfícies do osteoclasto e do osso alveolar. REr, retículo endoplasmático rugoso. Barra: 1 µm.

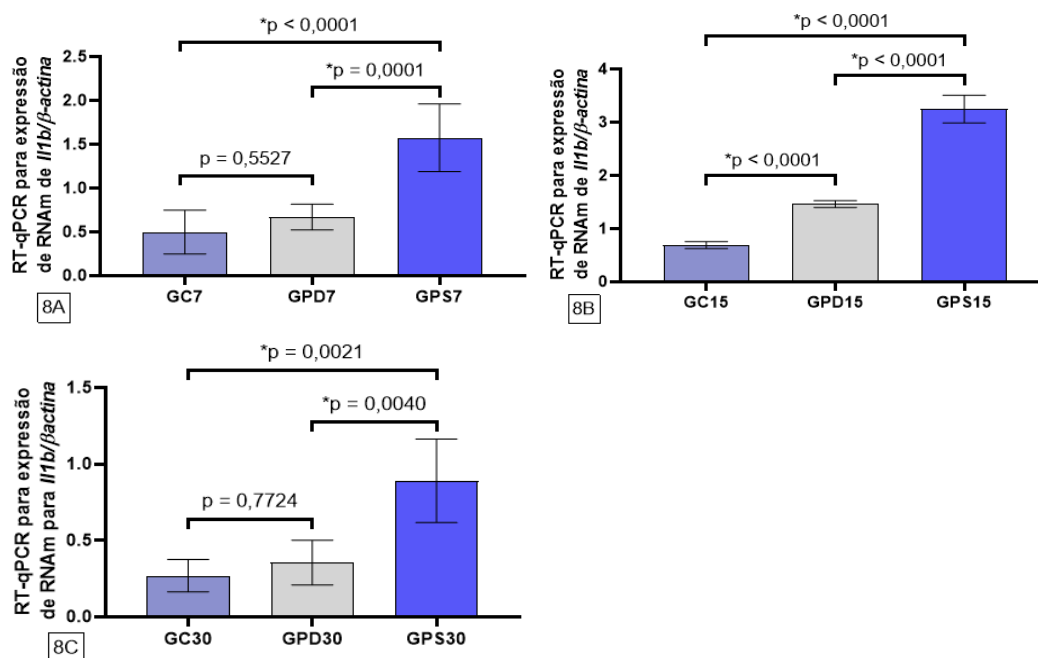
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5.5 Expressão Gênica (RT-qPCR)

Em todos os períodos, os espécimes do GPD apresentaram diminuição significativa na expressão *Il1b* em relação ao GPS (Figuras 8A-8C). Aos 7 e 30 dias, diferenças significantes na expressão de *Il1b* não foram observadas entre os espécimes dos grupos GPD e GC enquanto, aos 15 dias, a expressão de *Il1b* foi maior no GPD em comparação ao GC. Em contraste, o GPS apresentou níveis significativamente maiores na expressão gênica de *Il1b* em comparação ao GC, em todos os períodos.

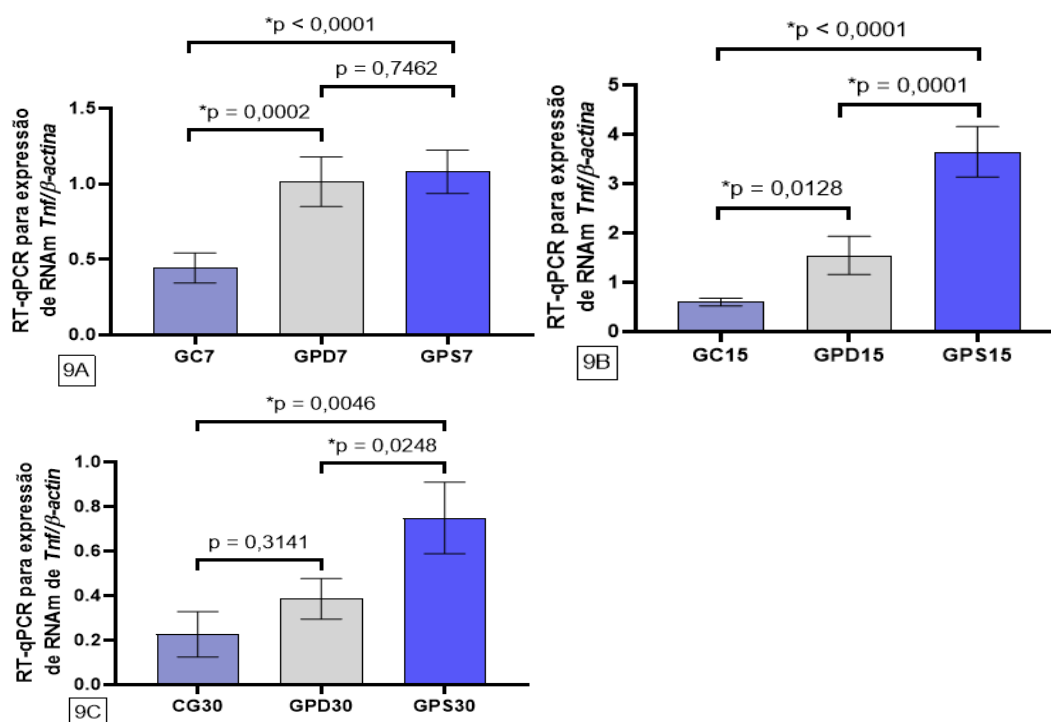
Conforme ilustra a Figura 9, embora aos 7 dias não tenha sido observada diferença significativa na expressão de *Tnf* entre os grupos GPD e GPS, a expressão gênica para esta citocina foi significativamente menor no GPD em comparação ao GPS, nos períodos de 15 e 30 dias. Além disso, aos 30 dias não foi observada diferença significativa entre os grupos GPD e GC (Figura 9C).

Figura 8- Expressão gênica de *Il1b*



Figuras 8A-8C: Gráficos representando a expressão gênica de *Il1b* nos períodos de 7 (8A), 15 (8B) e 30 (8C) dias. Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey. Nível de significância $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

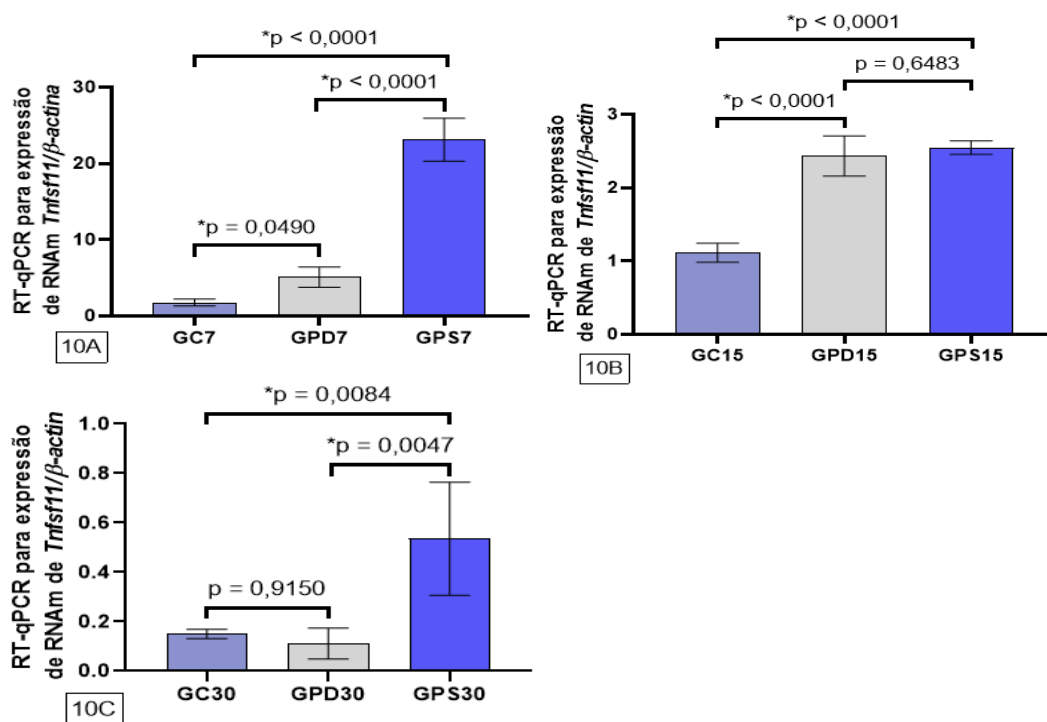
Figura 9- Expressão gênica de *Tnf*

Figuras 9A-9C: Gráficos representando a expressão gênica de *Tnf* nos períodos de 7 (9A), 15 (9B) e 30 (9C) dias. Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey. Nível de significância $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

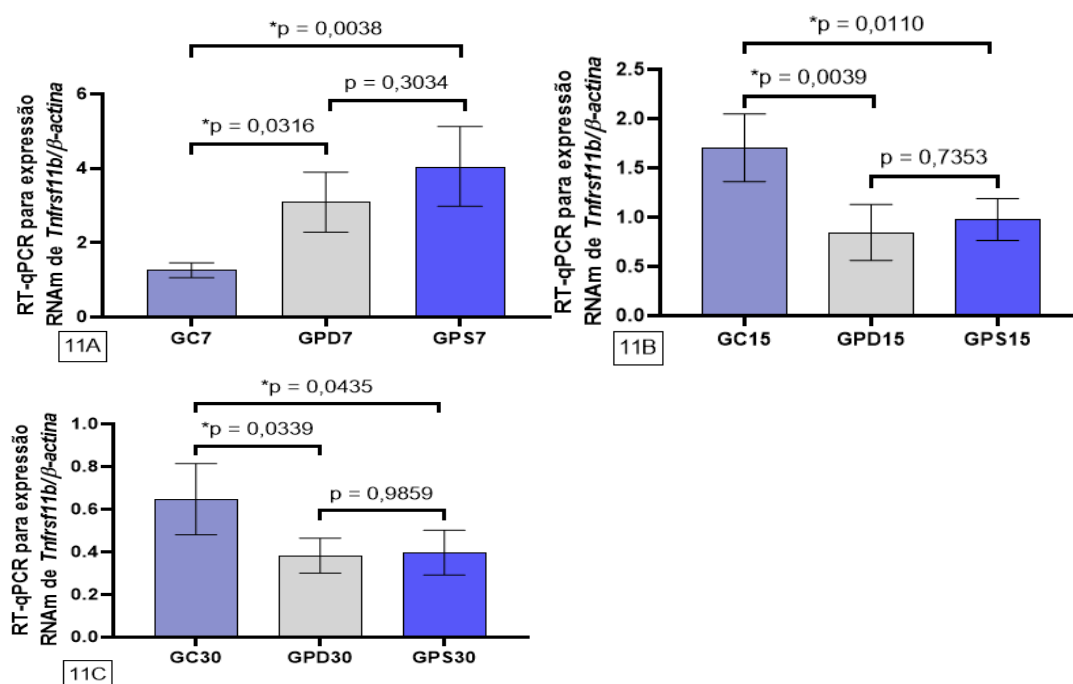
De acordo com as Figuras 10A-10C, os espécimes do GPD apresentaram menor expressão do gene de *Tnfsf11*, para a transcrição de RANKL, em comparação aos do GPS após 7 e 30 dias. Nestes períodos, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos GC e GPD. Aos 15 dias, diferenças significantes não foram detectadas entre os grupos GPD e GPS, os quais mostraram expressão gênica significativamente maior que os espécimes do GC. Em todos os períodos, o GPS apresentou valores significativamente superiores aos espécimes do GC. A expressão gênica de *Tnfrsf11b* (OPG) não apresentou diferenças significantes entre os espécimes dos grupos GPD e GPS, em todos os períodos. Entretanto, tal expressão foi significativamente menor nestes grupos em comparação ao GC, em todos os períodos (Figuras 11A-11C). A razão entre *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG; Figura 12) revelou que, em todos os períodos, tal razão foi significativamente maior no GPS em comparação ao GPD e GC. Embora aos 7 e 15 dias os valores da razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* foram maiores no GPD em comparação ao GC, nenhuma diferença significativa foi observada entre estes dois grupos aos 30 dias.

Figura 10- Expressão gênica de *Tnfsf11* (RANKL)

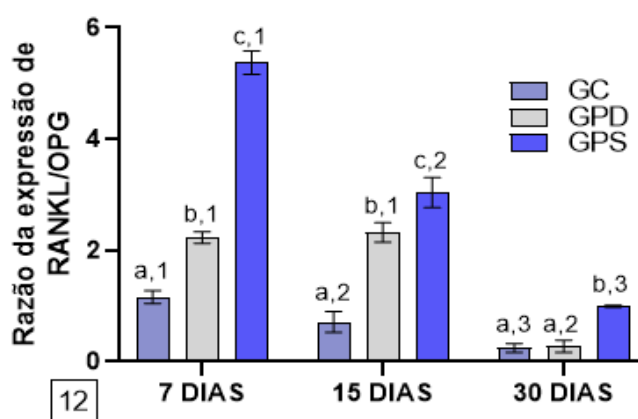


Figuras 10A-10C: Gráficos representando a expressão gênica de *Tnfsf11* nos períodos de 7 (10A), 15 (10B) e 30 (10C) dias. Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey. Nível de significância $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 11- Expressão gênica de *Tnfrsf11b* (OPG)**Figuras 11A-11C:** Gráficos representando a expressão gênica de *Tnfrsf11b* nos períodos de 7 (11A), 15 (11B) e 30 (11C) dias. Teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey. Nível de significância $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12- Razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG)**Figuras 12:** Gráfico representando a razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. A comparação entre os grupos está indicada por letras minúsculas e entre os períodos, por números. Letras e números diferentes indicam diferenças estatísticas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a redução causada pela diacereína na expressão de *Tnf* e *Il1b* na mucosa gengival deve induzir a diminuição da osteoclastogênese. Essa hipótese é reforçada pela significativa redução na razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG) no GPD. O presente estudo sugere fortemente que a diacereína administrada sistemicamente promove a apoptose de osteoclastos em osso alveolar de molares de ratos com periodontite. Além disso, os resultados indicam que a diacereína induz a diferenciação de osteoblastos visto que um marcante aumento da imunoexpressão de ALPase foi observado em osteoblastos do osso alveolar dos animais do GPD.

A periodontite induzida por 7 dias nos molares dos animais dos grupos GPD e GPS foi confirmada pelas seguintes características morfológicas: migração do epitélio juncional, aspecto ulcerado da gengiva interdentária, presença marcante de células inflamatórias, presença de profundas papilas conjuntivas na interface entre tecido epitelial e lâmina própria, além da significativa perda do processo alveolar, particularmente na região entre o primeiro e segundo molares. Uma acentuada perda do processo alveolar e a persistência do processo inflamatório foram reportadas em ratos com periodontite após 7, 15 e 30 dias da remoção da ligadura⁶⁵. No presente estudo, o significativo aumento da expressão de *Il1b*, *Tnf* e *Tnfsf11* nos espécimes do GPS confirma que a ligadura por 7 dias foi um modelo eficiente para estimular a atividade osteoclástica e, portanto, permitiu a avaliação da interferência da diacereína na formação e sobrevivência de osteoclastos do osso alveolar. Na periodontite, o organismo do hospedeiro recruta células que liberam enzimas líticas e mediadores inflamatórios, como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), além de complexos proteicos, como RANK/RANKL/OPG, e fatores de transcrição que estimulam a osteoclastogênese e inibem a atividade de osteoblastos, culminando na perda óssea^{19,39}.

A IL-1 possui duas isoformas, a IL-1 α e a IL-1 β , mas ambas se ligam aos mesmos receptores (IL1R tipo 1 e tipo 2) e são sintetizadas a partir da ativação dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1 (proteína ativadora 1), e estão envolvidas na atividade osteoclástica em vários processos, como a diferenciação, multinucleação, ativação e sobrevivência⁵⁵. Além disso, existem dois tipos de receptores conhecidos

para a IL-1, o receptor estimulador (IL-1R1 ou receptor tipo 1) e receptor supressor (IL-1R2 ou receptor tipo 2) expressos em níveis semelhantes na superfície de osteoclastos maduros em osso saudável. Por outro lado, em condições patológicas como a artrite, os receptores estimuladores (IL-1R1) são majoritariamente expressos em osteoclastos ativados, induzindo evidente destruição óssea^{55,85}. A IL-1 β aumenta a produção de RANKL e, conseqüentemente, estimula a reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro*⁴⁵. Além disso, a IL-1 β também promove diferenciação de osteoclastos independente da via RANKL⁸⁶. A ação inibitória da diacereína sobre a IL-1 β é explicada por meio da redução do IL-1R⁴, inibição da enzima ativadora de IL-1 (caspase-1)⁷² e aumento da produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra)⁷³. Em conformidade, a diacereína parece também ser capaz de neutralizar o aumento dos níveis hepáticos de NLRP3 e IL-1 β e imunoexpressão de caspase-1, observado após injeção de paracetamol em camundongos⁸⁷. No presente estudo foi demonstrado que o tratamento sistêmico com diacereína deve ser responsável pela redução significativa da expressão de *Tnfsf11* nos espécimes do GPD em relação aos do GPS, aos 7 e 30 dias através da redução da expressão gênica de *Il1b* no tecido gengival de ratos com periodontite induzida por ligadura.

Bloqueadores de TNF- α em pacientes com artrite reumatoide causou um aumento na quantidade de marcadores de neoformação, como a ALPase e osteocalcina, além da redução de marcadores de reabsorção óssea como desoxipiridinolina/creatina (Dpd/Crea) e fragmentos de colágeno I telopeptídeo N-terminal/creatina (NTx/Crea), evidenciando uma possível ação protetora exercida pela terapia anti-TNF- α ⁸⁸. O TNF- α ativa o NF-kb, estimulando proteína quinase ativada por mitógeno (MEK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e quinase c-Jun-N-terminal (JNK)⁸⁹. NF-kb e AP-1 induzem a expressão inicial de NFATc1, um fator de transcrição auto-amplificado que regula a expressão de genes específicos de osteoclastos como TRAP, MMP-9 e catepsina K, em conjunto com NF-kB e AP-1⁸⁶. Além disso, o TNF- α estimula a formação de osteoclastos na presença de M-CSF, por meio dos receptores TNFR1 e TNFR2, de modo independente de RANK/RANKL/OPG⁹⁰. Visto que a periodontite experimental estimula a expressão de TNF- α ⁹¹ e que esta citocina influencia na diferenciação, atividade e sobrevivência de osteoclastos, poderíamos sugerir que o tratamento com diacereína parece ter um efeito protetor no tecido ósseo, pois a expressão para transcrição dessa citocina

reduziu após 15 dias de tratamento. Este resultado está de acordo com o estudo de Gao et al.⁹², no qual a reína foi capaz de inibir a expressão de TNF- α em cultura de macrófagos obtidos de camundongos. O TNF- α está relacionado ao aumento da sobrevivência de osteoclastos pois reduz a apoptose dessas células por meio da redução de caspase-9 que cliva pro-caspase-3 em caspase-3 ativa, uma protease importante na cascata irreversível do processo de apoptose^{93,94}.

De fato, foi observada uma marcante redução na expressão do *Tnf*, aos 15 e 30 dias e, em todos os períodos, na expressão da *Il1b* nos animais do GPD. A redução na expressão destes genes deve ser responsável, pelo menos em parte, pela maior frequência de osteoclastos TUNEL-positivos nos animais do GPD indicando, portanto, que a diacereína, uma droga anti-IL-1 β e TNF- α , deve promover a morte de osteoclastos. Como o método do TUNEL detecta terminais 3'-hidroxila nos fragmentos de DNA contendo cerca de 180 pares de bases que ocorrem nos processos de morte celular, tanto em células em necrose ou em apoptose⁸¹, a detecção da caspase-3 e a análise ultraestrutural têm sido associadas ao TUNEL para caracterizar o processo de morte celular por apoptose^{82,83,95}. A caspase-3 é uma caspase executora responsável pela clivagem de substratos nas etapas finais da apoptose, como proteínas do citoesqueleto, além de ativar nucleases que realizam a fragmentação do DNA⁸³. No presente estudo, uma acentuada imunorreatividade à caspase-3 foi observada nos osteoclastos do grupo GPD em todos os períodos, em relação ao GPS e GC. Elevados níveis de TNF- α reduz a liberação de caspase-9, uma enzima essencial para clivar a pro-caspase-3 para caspase-3, uma protease envolvida na complexa cascata de eventos moleculares que conduzem a morte celular por apoptose^{93,94}. Dessa maneira, é concebível sugerir que a acentuada expressão de *Tnf* observada nos espécimes do GPS deve explicar a fraca imunoexpressão de caspase-3 observada nos osteoclastos dos espécimes deste grupo. Além disso, a significativa redução da expressão do *Tnf* no GPD aos 15 e 30 dias associado a presença de osteoclastos fortemente positivos à caspase-3 e a maior incidência de osteoclastos TUNEL-positivos suporta a ideia de que a diacereína, um anti-TNF- α e anti-IL-1, induz apoptose em osteoclastos. Adicionalmente, a microscopia eletrônica de transmissão revelou osteoclastos exibindo núcleos irregulares e com massas de cromatina condensada nos animais do GPD. Nestes osteoclastos alterados, não foram observadas zona clara e borda em escova. Estas características ultraestruturais são semelhantes

àquelas apresentadas por osteoclastos em apoptose induzida pelo estrógeno^{95,96,98}, cimetidina⁸² e bifosfonatos^{99,100}, indicando que a supressão de *Tnf* e *Il1b* pela diacereína pode induzir a apoptose de osteoclastos.

O tratamento com diacereína, um anti-TNF- α e anti-IL-1 β , causou redução significativa na razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG), indicando que este medicamento deve inibir a osteoclastogênese. Evidente redução na expressão gênica de *Tnfsf11* (RANKL) foi induzida pela diacereína após 7 e 30 dias, enquanto marcantes alterações não foram observadas na expressão de *Tnfrsf11b*. Sabe-se que a interação do RANKL ao seu receptor (RANK) resulta em diferenciação e ativação de osteoclastos⁴¹. Em contraposição, a osteoprotegerina (OPG) atua como inibidor de osteoclastogênese, ligando-se ao RANKL e impedindo sua ligação com o RANK^{9,26,41,82}. *In vitro*, a diacereína foi relacionada à diminuição da expressão de RNAm de *Tnfsf11* e aumento da expressão de *Tnfrsf11b*¹⁰¹. Dessa maneira, a proporção entre RANKL:OPG tem sido considerada como um importante indicativo da sinalização da osteoclastogênese, tendo mais relevância do que os parâmetros analisados isoladamente^{9,44}. No presente estudo, a razão dos valores da expressão gênica de *Tnfsf11/Tnfrsf11b*, reduziu no grupo GPD em todos os períodos, reforçando a ideia de que a diacereína reduziu a osteoclastogênese.

Embora um estudo realizado em nosso laboratório tenha demonstrado que, após 7 dias de tratamento, a diacereína causou significativa redução no processo inflamatório induzido pela ligadura no molar de ratos⁶⁵, a diacereína não interferiu no número de macrófagos F4/80⁺ recrutados pela doença periodontal. É importante considerar que os macrófagos constituem uma população de células que, dentre as suas diversas funções, destaca-se sua atividade fagocítica, assim também como monócitos e células dendríticas¹⁰². Assim, após 7 dias da remoção da ligadura, em ambos os grupos (GPD e GPS), é concebível sugerir que o aumento dos macrófagos esteja associado a fagocitose e digestão de células inflamatórias em degeneração, restos celulares e componentes da matriz extracelular parcialmente degradados em consequência do processo de remodelação do tecido conjuntivo da mucosa gengival. De fato, foi demonstrado um aumento significativo de MMP-8 na mucosa gengival inflamada de molares de ratos após a remoção da ligadura⁶⁵, suportando a hipótese que a degradação dos componentes da matriz extracelular constitui uma etapa necessária para a reparação do tecido conjuntivo subepitelial da gengiva. Outro ponto

que deve ser considerado é que o F4/80 é expresso por dois subtipos de macrófagos, M1 e M2, sendo o M1, uma célula fagocitária enquanto o M2, com função reparadora^{58,59}. Na periodontite, o M1 pode estimular o recrutamento de polimorfonucleares que fagocitam e digerem os patógenos, enquanto o M2 interrompe a progressão da doença induzindo a apoptose do M1 e estimulando reparo tecidual por meio do seu papel anti-inflamatório, além de poder ativar osteoblastos¹⁰³. De um ponto de vista do sistema imunitário, monócitos e macrófagos são fagócitos mononucleares F4/80⁺ capazes de produzir IL-1 e TNF- α após estímulo pelo LPS bacteriano⁷⁵. Contudo, nossos resultados mostraram que não houve diferenças significantes na quantidade de células F4/80⁺ entre os grupos GPS e GPD. Considerando que tanto o M1 quanto o M2 expressam o F4/80 e desempenham funções importantes na periodontite, seria necessária a análise para cada tipo de macrófago, além do cálculo da razão M1/M2 (CD86⁺/CD206⁺)¹⁰⁴. A significativa redução na imunoexpressão de MMP-8, associada ao aumento de colágeno reportado na mucosa gengival de ratos com periodontite tratados com diacereína⁶⁵, sugere que este fármaco deve acelerar a reorganização do tecido conjuntivo. Dessa maneira, seria plausível sugerir que o M2 deve ser o tipo predominante na mucosa gengival. No entanto, futuros estudos são necessários para diferenciar os dois tipos de macrófagos e, conseqüentemente, melhor esclarecer a participação desta célula no processo de remodelação da mucosa gengival.

O efeito inibidor da diacereína sobre o RNAm de *Tnf* e *Il1b* na periodontite induzida deve também explicar o significativo aumento observado na imunoexpressão da ALPase observada nos osteoblastos do processo alveolar nos animais do GPD. Embora o papel da ALPase não esteja completamente elucidado, sabe-se que essa enzima degrada o pirofosfato (PPi), um inibidor da formação de cristais de hidroxiapatita, por meio de duas outras proteínas, a pirofosfatase/fosfodiesterase ectonucleotídea 1 e a proteína de anquilose progressiva^{105,106}. Há evidência de que a ALPase também é capaz de inativar a osteopontina, um inibidor de calcificação¹⁰⁶. Um aumento dos níveis de RNAm de *Alpl* (ALPase) foi também demonstrado quando tiomida, um derivado da reína, foi adicionada à cultura de osteoblastos, resultando em aumento da precipitação de nódulos de calcificação detectada pelo método de coloração com vermelho de alizarina¹⁰⁷.

Dessa maneira, nossos resultados indicam que a diacereína administrada sistemicamente reduz os níveis de RNAm do *Tnf* e *Il1b* na mucosa gengival de ratos com periodontite, culminando na diminuição da formação e do tempo de sobrevivência dos osteoclastos. Além disso, a redução da expressão de *Tnf* e *Il1b*, causada pela diacereína na periodontite induzida em ratos, estimulou a atividade de ALPase em osteoblastos, sugerindo que este anti-inflamatório pode estimular a diferenciação de osteoblastos. No entanto, futuras pesquisas são necessárias para reforçar a ideia de que a diacereína na periodontite, além de inibir a formação e a sobrevivência de osteoclastos, pode estimular também a atividade de osteoblastos, favorecendo a reparação periodontal.

7 CONCLUSÃO

Nos ratos com periodontite, a redução de *Tnf* e *Il1b*, causada pela diacereína, não foi capaz de reduzir a população de macrófagos F4/80, mas promoveu uma diminuição na razão *Tnfsf11/Tnfrsf11b* (RANKL/OPG), através da supressão de *Tnf* e *Il1b*, indicando que este fármaco inibe a osteoclastogênese. A redução de *Tnf* e *Il1b* também induziu apoptose nos osteoclastos e promoveu um aumento na atividade da ALPase nos osteoblastos. Estes resultados reforçam o conceito de que estas citocinas são cruciais para a formação e sobrevivência dos osteoclastos, e que a diacereína parece induzir a diferenciação de osteoblastos em ratos com periodontite.

REFERÊNCIAS*

1. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. *Int Dent J*. 2021; 71(6): 462-76.
2. Bartold PM. Lifestyle and periodontitis: the emergence of personalized periodontics. *Periodontol 2000*. 2018; 78(1): 7-11.
3. Yang B, Pang X, Li Z, Chen Z, Wang Y. Immunomodulation in the treatment of periodontitis: progress and perspectives. *Front Immunol*. 2021; 12: 781378.
4. Zaki BM, Mahmoud EA, Aly AA. Diacerein: a potential therapeutic drug for the management of experimental periodontitis in rats. *Electron Physician*. 2015; 7: 1290.
5. Almezgagi M, Zhang Y, Hezam K, Shamsan E, Gamah M, Al-Shaebi F et al. Diacerein: recent insight into pharmacological activities and molecular pathways. *Biomed Pharmacother*. 2020; 131: 110594.
6. Helmi MF, Huang H, Goodson JM, Hasturk H, Tavares M, Natto ZS. Prevalence of periodontitis and alveolar bone loss in a patient population at Harvard School of Dental Medicine. *BMC Oral Health*. 2019; 19(1): 254.
7. Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: evidence, mechanisms, and implications. *Periodontol 2000*. 2022; 89(1): 9-18.
8. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991; 26(3 Pt 2): 230-42.
9. Longhini R, Aparecida de Oliveira P, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol*. 2014; 85(8): 1115-25.
10. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol*. 2017; 88(1): 100-11.
11. Hinrichs JE, Kotsakis G. Classificação das doenças e condições que afetam o periodonto. *In*: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontia clínica*: 12. ed. Trad. Ferreira Robaina T. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p.44-66.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Rathee M, Jain P. Gingivitis. *In: StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [acesso em 10 fev. 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557422/>.
13. Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Odontologia: arte, ciência e técnica. 20. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002. v.5.
14. Papapanou PN, Lindhe J. Epidemiologia das doenças periodontais. *In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Trad Kuchenbecker Rosing C. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. p.123-72.*
15. Boukortt KN, Saidi-Ouahrani N, Boukerzaza B, Ouhaibi-Djellouli H, Hachmaoui K, Benaissa FZ et al. Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(10): 1463-70.
16. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2014; 64(1): 57-80.
17. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* 2019; 42(1): 27-35.
18. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17038.
19. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.* 2018; 18(1): e8.
20. Strålberg F, Kassem A, Kasprzykowski F, Abrahamson M, Grubb A, Lindholm C et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo by cysteine proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol.* 2017; 101(5): 1233-43.
21. Šromová V, Sobola D, Kaspar P. A brief review of bone cell function and importance. *Cells.* 2023; 12(21): 2576.
22. Murshed M. Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020; 8(12): a031229.
23. Junqueira, LC; Carneiro, J. Histologia básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
24. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2018; 16(3): 205-15.

25. Arana V, Katchburian E. *Histologia e embriologia oral*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2023.
26. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 421746.
27. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561: 3-12.
28. Linder CH, Ek-Rylander B, Krumpel M, Norgård M, Narisawa S, Millán JL et al. Bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: potential co-regulators of bone mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2017; 101(1): 92-101.
29. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020; 754: 144855.
30. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006; 99(5): 1233-9.
31. Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: the nexus between bone and immune system. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018; 23(3): 464-92.
32. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(2): 229-38.
33. Intemann J, De Gorter DJJ, Naylor AJ, Dankbar B, Wehmeyer C. Importance of osteocyte-mediated regulation of bone remodelling in inflammatory bone disease. *Swiss Med Wkly*. 2020; 150: w20187.
34. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011; 17(10): 1231-4.
35. Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005; 5(4): 325-7.
36. Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(7): 2075-89.
37. Zhou M, Graves DT. Impact of the host response and osteoblast lineage cells on periodontal disease. *Front Immunol*. 2022; 13: 998244.
38. Takito J, Inoue S, Nakamura M. The sealing zone in osteoclasts: a self-organized structure on the bone. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(4): 984.

39. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in alveolar bone loss. *Front Immunol*. 2021; 12: 691013.
40. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003; 38(4): 380-7.
41. Costa LC, Fonseca MAD, Pinheiro ADR, Aguiar TRDS, Machado AN, Quinelato V, et al. Chronic periodontitis and RANKL/OPG ratio in peri-implant mucosae inflammation. *Braz Dent J*. 2018; 29(1): 14-22.
42. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: S1.
43. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3): 705.
44. Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Zazzeroni F, Di Benedetto P et al. The role of IL-1 β in the bone loss during rheumatic diseases. *Mediators Inflamm*. 2015; 782382.
45. Pan W, Wang Q and Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int. J. Oral Sci*. 2019. 11(3).
46. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res*. 2016; 51(5): 549-66.
47. Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T. Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem*. 1998; 273(15): 8799-805.
48. Lee D, Long SA, Murray JH, Adams JL, Nuttall ME, Nadeau DP et al. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *J Med Chem*. 2001; 44(12): 2015-26.
49. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ*. 2003; 10(10): 1165-77.
50. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, Nanes MS. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000; 141(11): 3956-64.
51. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Aizaki Y, Tanaka S, Sekikawa M et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2021; 73(7): 1145-54.

52. Mencoboni M, Lerza R, Bogliolo G. Il tumor necrosis factor: una citochina dalle molteplici azioni [Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple actions]. *Recenti Prog Med*. 1992; 83(1): 15-7. Italian
53. Nason R, Jung JY, Chole RA. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2009; 10(2): 151-60.
54. Nakamura I, Jimi E: Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitam Horm* 2006; 74: 357-70.
55. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1987; 2(6): 559-65.
56. Lee YM, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Int Immunol* 2010; 22(10): 805-16.
57. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
58. Schlundt C, Fischer H, Bucher CH, Rendenbach C, Duda GN, Schmidt-Bleek K. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. *Acta Biomater*. 2021; 133: 46–57.
59. Yu T, Zhao L, Huang X, Ma C, Wang Y, Zhang J et al. Enhanced activity of the macrophage M1/M2 phenotypes and phenotypic switch to M1 in periodontal infection. *J Periodontol*. 2016; 87(9): 1092-102.
60. Aleksander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(7): 1517-32.
61. Azuma K, Adachi Y, Hayashi H, Kubo KY. Chronic psychological stress as a risk factor of osteoporosis. *J UOEH*. 2015; 37(4): 245-53.
62. Alpan AL, Bakar O, Kızıldağ A, Özdede M, Topsakal Ş, Özmen Ö. Effects of taxifolin on bone formation and apoptosis in experimental periodontitis in diabetic rats. *Biotech Histochem*. 2022; 97(4): 306-314.
63. Li X, Zhou R, Han Y, Zeng J, Shi L, Mao Y et al. Silibinin attenuates experimental periodontitis by downregulation of inflammation and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2023; 2023: 5617800.
64. Silva RCL, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Diacerein-induced interleukin-1 β deficiency reduces the inflammatory infiltrate and immunoexpression of matrix metalloproteinase-8 in periodontitis in rat molars. *J Periodontol*. 2022; 93(10): 1540-52.

65. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host modulation and treatment of periodontal disease. *J Dent Res*. 2021; 100(8): 798-809.
66. Wally V, Kitzmueller S, Lagler F, Moder A, Hitzl W, Wolkersdorfer M et al. Topical diacerein for epidermolysis bullosa: a randomized controlled pilot study. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8: 69.
67. Huang R, Lu S, Su K, Chen J, Fang W, Liao W et al. Diacerein: a potential therapeutic drug for periodontal disease. *Med Hypotheses*. 2012; 79(2): 165-7.
68. Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM. Possible protective effect of diacerein on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Toxicol*. 2016; 9507563.
69. Chueakula N, Jaikumkao K, Arjinajarn P, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakom N et al. Diacerein alleviates kidney injury attenuating inflammation and oxidative stress in obese insulin-resistant rats. *Free Radic Biol Med*. 2017; 115: 146-55.
70. Filardo G, Kon E, Longo UG, Madry H, Marchettini P, Marmotti A et al. Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016; 24(6): 1775-85.
71. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP. In vitro effects of diacerein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor- α systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J Rheumatol*. 1998; 25(4): 753-62.
72. Pavelka K, Bruyère O, Cooper C, Kanis JA, Leeb BF, Maheu E et al. Diacerein: benefits, risks and place in the management of osteoarthritis. An opinion-based report from the ESCEO. *Drugs Aging*. 2017; 34(5): 413.
73. Spencer CM, Wilde MI. Diacerein. *Drugs*. 1997 Jan;53(1):98-106; discussion 107-8.
74. Suda T. [How is bone formed and resorbed? molecular mechanisms of bone formation and resorption]. *Rinsho Byori*. 2002; 50(3): 267-72. Japanese.
75. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-Mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015; 30(1): 35-44.
76. Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, Walker WH. NF- κ B and TNF- α stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 201(1-2): 1-12.
77. O'Bryan MK, Hedger MP. Inflammatory networks in the control of spermatogenesis: chronic inflammation in an immunologically privileged tissue? *Adv Exp Med Biol*. 2008; 636: 92-114.

78. Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur J Pharmacol.* 2002; 448(1): 81-7.
79. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res.* 2003; 38(2): 223-6.
80. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 1995; 21(5): 1465-8.
81. Longhini R, de Oliveira PA, de Souza Faroni AP, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J Anat.* 2013; 222: 239-47.
82. Pizzol Júnior JP, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Apoptosis and reduced microvascular density of the lamina propria during tooth eruption in rats. *J Anat.* 2015; 227(4): 487-96.
83. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *Int J Mol Sci.* 2020; 21(23): 9090.
84. Shiratori T, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita A, Uehara N, Zhang J, Koda K et al. IL-1 β induces pathologically activated osteoclasts bearing extremely high levels of resorbing activity: a possible pathological subpopulation of osteoclasts, accompanied by suppressed expression of kindlin-3 and talin-1. *J Immunol.* 2018; 200(1): 218-228.
85. Son HS, Lee J, Lee HI, Kim N, Jo YJ, Lee GR et al. Benzydamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1 β expression. *Acta Pharm Sin B.* 2020; 10(3): 462-474.
86. Elshal M, Abdelmageed ME. Diacerein counteracts acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via targeting NLRP3/caspase-1/IL-1 β and IL-4/MCP-1 signaling pathways. *Arch Pharm Res.* 2022; 45(3): 142-158.
87. Seriole B, Paolino S, Sulli A, Cutolo M. La terapia con anti TNF-alfa ha effetti positivi sul metabolismo osseo? [Are there any positive effects of TNF-alpha blockers on bone metabolism?]. *Reumatismo.* 2006; 58(3): 199-205. Italian.
88. Ferreira-Junior AEC, Barros-Silva PG, Oliveira CC, Lima Verde MEQ, Sousa FB, Mota MRL et al. Influence of infliximab therapy on bone healing post-dental extraction in rats. *Arch Oral Biol.* 2020; 112: 104680.
89. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(12): 1412-21

90. Gao Y, Chen X, Fang L, Liu F, Cai R, Peng C et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2014; 72: 104-12.
91. Lee D, Long SA, Murray JH, Adams JL, Nuttall ME, Nadeau DP et al. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *J Med Chem*. 2001; 44(12): 2015-26.
92. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ*. 2003; 10(10): 1165-77.
93. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Rocha FR, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J Anat*. 2012; 220(1): 77-85.
94. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(35): 12815-9.
95. Faloni APS, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res*. 2007; 42: 193-201.
96. Cruzoé-Souza M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunohistochemical detection of estrogen receptor β in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. *J Anat*. 2009; 215: 673-81.
97. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Bisphosphonate acts on osteoclasts independent of ruffled borders in osteosclerotic (oc/oc) mice. *Bone* 2001; 28: 609-16.
98. Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Victor E, Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res*. 2013; 353: 79-86.
99. Wang L, Mao YJ, Wang WJ. [Inhibitory effect of diacerein on osteoclastic bone destruction and its possible mechanism of action]. *Yao Xue Xue Bao*. 2006; 41(6): 555-60. Chinese.
100. Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL, Green DR. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020; 21(7): 398-414.
101. Sun X, Gao J, Meng X, Lu X, Zhang L, Chen R. Polarized Macrophages in Periodontitis: Characteristics, Function, and Molecular Signaling. *Front Immunol*. 2021; 12: 763334.

102. Chen MH, Wang YH, Sun BJ, Yu LM, Chen QQ, Han XX et al. HIF-1 α activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization. *Int Immunopharmacol.* 2021; 99: 107901.
103. Bobryshev YV, Orekhov AN, Sobenin I, Chistiakov DA. Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(37): 5821-8.
104. Nizet A, Cavalier E, Stenvinkel P, Haarhaus M, Magnusson P. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder. *Clin Chim Acta.* 2020; 501: 198-206.
105. Jiang M, Wang T, Yan X, Liu Z, Yan Y, Yang K et al. A Novel Rhein derivative modulates bone formation and resorption and ameliorates estrogen-dependent bone loss. *J Bone Miner Res.* 2019; 34(2): 361-374.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA****CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº 17/2018 referente à pesquisa “**EFEITO DA DIACEREÍNA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM MOLARES DE RATOS**” sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pela legislação brasileira atualmente em vigor, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

CERTIFICATE

We certify that the protocol 17/2018 referring to the research “**EFFECT OF DIACEREIN IN THE TREATMENT OF INDUCED PERIODONTAL DISEASE IN RAT MOLARS**” under responsibility of **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri** in agreement with the nowadays specific Brazilian laws and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA).

Araraquara, 26 de maio de 2021.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA/FOAr/UNESP

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO CEUA PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***“INTERFERÊNCIA DA DIACEREÍNA NA OSTEOLASTOGÊNESE ASSOCIADA À REABSORÇÃO DO PROCESSO ALVEOLAR NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM MOLARES DE RATOS”***, registrada com o nº 12/2020, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 14/08/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato Holtzman
Nº de animais	72
Peso/Idade	220-250g/Adultos jovens
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da FOAr (Campus-Araraquara)


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRICIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua.foar@unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

ANEXO C – DECLARAÇÃO RELATÓRIO FINAL SUBMETIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
Faculdade de Odontologia



FOAR
FACULDADE
DE ODONTOLOGIA
DE ARARAQUARA

DECLARAÇÃO

DECLARO que a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP recebeu o relatório final do projeto ***"Interferência da diacereína na osteoclastogênese associada à reabsorção óssea do processo alveolar com doença periodontal induzida em molares de ratos"*** (PROCESSO CEUA Nº 12/2020), o qual foi apresentado pelo pesquisador Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri. O referido relatório deu entrada nesta Comissão em 09/02/2024 e se encontra em fase de tramitação para análise.

Araraquara, 15 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 GISELE FARIA
Data: 15/02/2024 14:27:01-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Dra. Gisele Faria
Vice-coordenadora da CEUA - FOAr

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data de defesa.

Direitos de publicação reservado ao autor.

Araraquara, 15 de março de 2024.

Gabriella de Oliveira