

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/03/2022.



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



Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes

Efeito de uma nova Chalcona sobre a reabsorção óssea inflamatória: estudo in vitro e in vivo

Araraquara

2020



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



Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes

Efeito de uma nova chalcona sobre a reabsorção óssea inflamatória: estudo in vitro e in vivo

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

Orientadora: Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara

2020

Fernandes, Natalie Aparecida Rodrigues

Efeito de uma nova Chalcona sobre a reabsorção óssea
inflamatória: estudo in vitro e in vivo / Natalie Aparecida
Rodrigues Fernandes.-- Araraquara: [s.n.], 2020
80 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães
Stabili

1. Chalcona 2. Reabsorção óssea 3. Doença
periodontal 4. Ratos 5. Macrófagos 6. Osteoclastos
I. Título

Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes

Efeito de uma nova Chalcona sobre a reabsorção óssea inflamatória: estudo in vitro e in vivo

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof^a. Dr^a. Morgana Rodrigues Guimarães Stalibi

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Maria José Hitomi Nagata

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palioto Bulle

Araraquara, 26 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes

NASCIMENTO: 14/03/1992 – São Paulo – SP

FILIAÇÃO: Luciana Aparecida Rodrigues Fernandes
Sebastião Batista Fernandes

2011 - 2017: Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP

2018 - 2020: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Morgana Rodrigues Guimarães Stabili**, por ter me aceitado e acolhido em um momento importante da minha vida. Obrigada por acreditar no meu potencial como pesquisadora e sempre me oferecer as ferramentas para crescer como profissional e pessoa. Com seu exemplo de dedicação, profissionalismo, altruísmo, competência e entusiasmo ao ensino e pesquisa, aprendi muito e me senti motivada a contruir uma melhor versão minha todos os dias. Agradeço por criar um ambiente de trabalho produtivo, movido pelo companheirismo e amizade dentro do grupo de pesquisa.

Aos professores **Carlos Rossa Junior** e **Laurival Antonio de Luca Junior**, por jamais medirem esforços em me apoiar e compartilhar seus conhecimentos. Meus exemplos de pesquisadores e pessoas. Sou eternamente grata por toda a ajuda e incentivo.

Aos demais orientados da professora Morgana: **Amanda Favoreto**, **Mariely Godoi**, **Larissa Kely**, **Angelo Constantino** e **Vitória Bonan** pela amizade, dedicação e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos meus amados pais, **Sebastião Batista Fernandes** e **Luciana Aparecida Rodrigues Fernandes**, que jamais mediram esforços e sacrifícios para me apoiar durante toda a minha jornada acadêmica. Com exemplos, apreendi com vocês os valores do ser humano e a nunca desistir dos meus objetivos. Vocês são os meus exemplos de respeito, superação, honestidade, humildade, empatia e determinação.

Às minhas queridas irmãs, **Iasmin Ap. Rodrigues Fernandes** e **Thais Ap. Rodrigues Fernandes**, que sempre me apoiaram em todos os meus projetos e a fazer aquilo que eu quero e acredito. Muito obrigada por ouvir sempre todos os meus problemas e nunca me deixar desistir. Vocês são o meu porto seguro.

Aos meus avós, **Manoel Rodrigues Marcos** e **Ana Maria Bueno Rodrigues**, que também jamais mediram esforços e sacrifícios para me apoiar em tudo! Vocês são

meus exemplos de determinação e honestidade. Obrigada por toda a dedicação, amor, carinho e compreensão pelos meus momentos de ausência.

Aos meus tios, **Fabiano Ap. Rodrigues** e **Jociene Amâncio de Camargo Rodrigues**, toda a gratidão pela atenção e pelo carinho no decorrer da minha vida, e em especial durante a minha fase de estudos. Os seus exemplos fizeram de mim parte do que sou como pessoa. Sem a ajuda, brincadeiras, apoio, amor e amizade a mim dedicados, eu não teria conquistado metade do que conquistei até o dia de hoje.

À **Gustavo Chagas Lutfala Paulino**, amor da minha vida, meu porto seguro, meu lar, meu tudo! Agradeço a você, que acompanhou de perto todos os momentos “altos” e “baixos” do mestrado, sempre esteve ao meu lado e NUNCA me deixou desistir ou de acreditar em mim mesma. Agradeço pelo seu apoio incondicional. Eu sou a mulher mais feliz do mundo por poder compartilhar os momentos da minha vida com você! Você é sensacional e eu te amo muito! Obrigada por tudo, meu companheiro de vida!

Aos meus companheiros de laboratório, em especial **Laura Gonzalez, Cindy Perez, Marcell Medeiros** e **Adriana Cabrera** pelo companheirismo, paciência, contribuição com o meu aprendizado e amizade!

Aos meus **companheiros e amigos de Mestrado**, obrigada por toda a ajuda e motivação!

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Claudinha, Isabela, Suleima e Lene**, agradeço por toda ajuda, disponibilidade e amizade!

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP** por toda a estrutura proporcionada para a realização deste curso.

Aos funcionários do setor de pós-graduação, **Cristiano** e **José Alexandre** pela gentileza e atenção de sempre.

Aos **professores da Disciplina de Periodontia** pela formação, orientação e convivência diária.

À prof. **Denise Spolidorio** e **Patricia Milagros Maquera Huacho** por disponibilizar seus materiais, conhecimento e ajuda para a realização da análise microbiológica do trabalho.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº 2018/10945-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** - (Processo nº 133311/2018-0)

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

“Tudo pode ser tirado do homem, menos uma coisa: a última das liberdades humanas - escolher sua atitude em qualquer circunstância, escolher o próprio caminho.” Viktor Frankl*

* Frankl V. Em busca de sentido. Petrópolis: Vozes; 1991.

Fernandes NAR. Efeito de uma nova Chalcona sobre a reabsorção óssea inflamatória: estudo in vitro e in vivo [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

As chalconas são um grupo de compostos fenólicos derivados de plantas, com diversas propriedades biológicas. Em função dos seus efeitos farmacológicos, diferentes derivados chalcônicos sintéticos, baseados em seus análogos naturais, têm sido investigados como agentes terapêuticos. Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado sua efetividade no tratamento de doenças inflamatórias como câncer e artrite, e em patologias ósseas como osteoporose e tumores ósseos. Considerando suas propriedades biológicas e com objetivo de identificar compostos que possam atuar no tratamento de doenças ósseo inflamatórias, avaliamos a habilidade de um novo composto chalcônico, a Chalcona T4, de suprimir a inflamação e osteoclastogênese em um modelo de doença periodontal. No estudo in vivo, um ensaio de toxicidade em camundongos demonstrou que a administração de diferentes doses da chalcona T4 (5, 50, 100 e 200 mg/kg) por um período de 15 dias, via intragástrica, diariamente, não causou alterações físicas ou comportamentais. Análise histopatológica do rim, fígado e estômago destes animais também indicaram ausência de toxicidade em todas as doses avaliadas. Determinada a ausência de toxicidade, periodontite foi experimentalmente induzida em ratos pela colocação de ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores. Chalcona T4 foi administrada diariamente por gavagem intragástrica em duas doses (5 e 50 mg/kg) durante 15 dias. Ao final do período experimental, as amostras contendo tecido gengival ou hemimandíbula da região de interesse foram removidos e utilizados para análise dos seguintes desfechos: determinação da expressão de TNF- α (ELISA); quantificação dos componentes celulares (infiltrado celular, fibras colágenas e vasos sanguíneos) através da análise estereométrica; avaliação da extensão da perda óssea (coloração com azul de metileno e microtomografia computadorizada (μ CT)); expressão e imunolocalização de NFATc1, NF- κ B e CD45 (imuno-histoquímica), ativação de p38 MAPK (Western Blot); e análise microbiológica das ligaduras (*Pg*, *Fn*, *Aa*) através de RT-qPCR. No estudo in vitro, células RAW 264.7 foram pré-tratadas com diferentes concentrações da chalcona (1, 2.5, 5 e 10 μ M) e estimuladas com RANKL para avaliação da expressão dos genes alvos (*Mmp-9*, *Ctsk*, *Oscar*, *Nfatc1* e *Trap*). Os efeitos da chalcona sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos foram avaliados por microscopia de fluorescência e medição das áreas de reabsorção em placas revestidas com fosfato de cálcio sintético, respectivamente. Seu impacto sobre as vias de sinalização NF- κ B, p38 MAPK, Erk e AKT foram avaliados por Western Blot. Os resultados in vivo indicam que a menor dose da Chalcona T4 reduziu a reabsorção óssea e o infiltrado inflamatório, bem como favoreceu a angiogênese e produção de matriz colágena nos tecidos gengivais periodontalmente doentes, além de modular a expressão de NF- κ B. In vitro, a Chalcona T4 foi capaz de inibir a diferenciação e atividade dos osteoclastos, reduzir de maneira dose-dependente a expressão de marcadores da osteoclastogênese, e modular a ativação de vias de sinalização intracelular (ERK, AKT e NF- κ B). Estes resultados demonstram a habilidade da Chalcona T4 na modulação da resposta imune inflamatória e osteoclastogênese, e indicam o potencial do composto no tratamento de doenças ósseo inflamatórias.

Palavras chave: Chalcona. Reabsorção óssea. Doença periodontal. Ratos. Macrófagos. Osteoclastos.

Fernandes NAR. Effect of a novel Chalcone on inflammatory bone resorption: in vitro and in vivo study. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Chalcones are a group of phenolic compounds derived from plants with diverse biological properties. Due to their pharmacological effects, different synthetic chalconic derivatives, based on their natural analogues, have been investigated as therapeutic agents. Clinical and preclinical studies have demonstrated its effectiveness in the treatment of inflammatory diseases such as cancer and arthritis, and in bone pathologies such as osteoporosis and bone tumors. Considering its biological properties and aiming to identify compounds that can act in the treatment of inflammatory bone diseases, we evaluated the ability of a new chalconic compound, Chalcone T4, to suppress inflammation and osteoclastogenesis in a model of periodontal disease. In the in vivo study, a toxicity test in mouse demonstrated that the daily intragastric gavage administration of different doses of chalcone T4 (5, 50, 100 and 200 mg/kg) for a period of 15 days, did not cause any physical or behavioral changes. Histopathological analysis of the kidney, liver and stomach of these animals also indicated absence of toxicity in all evaluated doses. Once the absence of toxicity was determined, periodontitis was experimentally induced in rats by ligature placement around the lower first molars. Chalcone T4 was administered daily by intragastric gavage in two doses (5 and 50 mg/kg) for 15 days. At the end of the experimental period, samples containing gingival or hemimandibular tissue from the region of interest were removed and used for analysis of the following outcomes: determination of TNF- α expression (ELISA); quantification of cellular components (cell infiltrate, collagen fibers and blood vessels) by stereometric analysis; evaluation of the extent of bone loss (methylene blue dye staining and computed microtomography (μ CT)); expression of NFATc1, NF- κ B and CD45 (immunohistochemistry), activation of p38 MAPK (Western Blot); and microbiological analysis of the ligatures (*Pg*, *Fn*, *Aa*) by RT-qPCR. In the in vitro study, RAW 264.7 cells were pretreated with different concentrations of chalcone (1, 2.5, 5 and 10 μ M) and stimulated with RANKL to evaluate the expression of target genes (*Mmp-9*, *Ctsk*, *Oscar*, *Nfatc1* and *Trap*). The effects of chalcone on osteoclast differentiation and activity were evaluated by fluorescence microscopy and measurement of resorption areas on plates coated with synthetic calcium phosphate, respectively. Their impact on the NF- κ B, p38 MAPK, Erk and AKT signaling pathways were assessed by Western Blot. The in vivo results indicate that the lowest dose of Chalcone T4 reduced bone resorption and inflammatory infiltrate, as well as favoring angiogenesis and collagen matrix production in the gingival tissues, in addition to modulating NF- κ B expression. In vitro, Chalcone T4 was able to inhibit osteoclast differentiation and activity, reduce dose-dependent expression of osteoclastogenesis markers, and modulate the activation of intracellular signaling pathways (ERK, AKT and NF- κ B). These results demonstrate the ability of Chalcone T4 in modulating the inflammatory immune response and osteoclastogenesis and indicate the potential of the compound in the treatment of inflammatory bone diseases.

Keywords: Chalcone. Bone resorption. Periodontal disease. Rats. Macrófagos. Osteoclasts.

ABREVIATURAS

Aa - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

AP-1 - Proteína ativadora-1

cDNA – DNA complementar

CMC – Carboximetilcelulose

CTSK – Catepsina K

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

Fn - *Fusobacterium nucleatum*

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H&E – Coloração por Hematoxilina e Eosina

IFN-gamma - Interferon-gamma

IkBa - proteína inibitória kappa B alpha

IL(-1; -6, -17) – Interleucina (-1; -6, -17)

IL-1β – Interleucina 1 beta

JNK - quinase c-Jun N-terminal

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

M-CSF - Fator estimulante de colônia de macrófagos

MITF - Fator de transcrição associado à microftalmia

MMP(-9; -13) – Metaloproteinases da matriz (-9; -13)

NFATc1 – Fator nuclear das células T ativadas

NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B

OPG - Osteoprotegerina

OSCAR – Receptor de ativação de osteoclasto

Pg – *Porphyromonas gingivalis*

PGE₂ – Prostaglandina E2

PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase

RANK – Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RAW 264.7 - macrófagos murinos

RNA – Ácido ribonucleico

RT-qPCR – Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAF6 – Fator associado 6 ao receptor TNF

TRAP - Fosfatase ácido tártaro resistente

μ CT – Microtomografia computadorizada

FBS – Soro fetal bovino

P/S – Penicilina-Estreptomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Reabsorção Óssea Inflamatória e Compostos Naturais Ativos	12
1.2 Chalconas	14
1.3 Chalconas Como Moduladoras do Turnover Ósseo na Periodontite	18
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 PUBLICAÇÃO	22
4 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS	55
APÊNDICE B – OUTROS RESULTADOS	70
ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reabsorção Óssea Inflamatória e Compostos Naturais Ativos

Duas das principais funções da inflamação são remover patógenos, e manter a homeostase tecidual. A resposta inflamatória aguda se inicia com a liberação de mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular, resultando no recrutamento de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) para o local da infecção, e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por estas células. Células imunes, que infiltraram o local da infecção, fagocitam os patógenos, quando presentes, e secretam metaloproteinases e fatores de crescimento para que ocorra a remodelação tecidual. A resolução da inflamação e restabelecimento da homeostase tecidual ocorrem pelo sucesso na remoção do patógeno e/ou consequente aumento de citocinas antiinflamatórias¹; entretanto, a perpetuação do processo inflamatório resulta na secreção contínua de citocinas e consequente destruição tecidual.

Todo este processo inflamatório está diretamente associado com a patogênese das doenças osteolíticas, como fraturas, osteoporose, artrite reumatoide e doença periodontal. Enquanto a inflamação aguda é importante para os processos de remodelação óssea, a inflamação crônica pode influenciar negativamente o *turnover* ósseo contribuindo para a progressão destas patologias.

O metabolismo ósseo é regulado através da atividade coordenada de osteoclastos e osteoblastos², e o aumento na diferenciação e atividade de osteoclastos está intimamente relacionado com a patogênese das doenças ósseas³. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, originadas de precursores hematopoiéticos cujo processo de diferenciação envolve uma série de etapas, tais como a diferenciação de células fosfatase ácida tartarato-resistentes (TRAP), fusão para formação de células multinucleadas, ativação da reabsorção óssea e apoptose espontânea⁴. Este processo de diferenciação é induzido fundamentalmente pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), que media a osteoclastogênese através da sua ligação com o receptor ativador nuclear kappa-B (RANK) presente nas células precursoras, e pelo fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), que transmite sinais de sobrevivência e proliferação às células pré-osteoclásticas⁵. A ligação de RANKL ao seu receptor RANK induz uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento do fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF6) e de várias vias *downstream*, tais como do fator de transcrição nuclear

kappa B (NF- κ B), proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (incluindo p38 MAPK, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e quinase c-Jun N-terminal (JNK))⁶, bem como ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) e o eixo Src/PI3K/Akt^{7,8}. Estas vias de sinalização, por sua vez, levam a ativação do fator nuclear das células T ativadas (NFATc1) que induz então a expressão de diversos genes como metaloproteinase 9 (MMP-9), catepsina K (CTSK), TRAP, receptor de ativação de osteoclasto (OSCAR) entre outros, que estão relacionados com a formação e atividade dos osteoclastos⁹.

NFATc1 é um regulador da diferenciação de osteoclastos, e está relacionado com a regulação de genes específicos desse processo, como TRAP, CTSK e OSCAR através da cooperação com o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) e c-Fos¹⁰⁻¹³. Células-tronco embrionárias deficientes para NFATc1 não podem se diferenciar em osteoclastos, entretanto, a expressão ectópica de NFATc1 em células precursoras de osteoclastos induz a diferenciação destas células, mesmo na ausência de RANKL¹⁰. Esses achados mostram que NFATc1 é um fator indispensável na diferenciação de osteoclastos.

OSCAR, um receptor associado a FcR γ , estimula a diferenciação destas células e tem sua expressão aumentada durante a diferenciação de osteoclastos¹⁴. A expressão de OSCAR tem sido associada com reabsorção óssea inflamatória. Na artrite reumatoide, a expressão de OSCAR em monócitos é correlacionada com a atividade da doença, e monócitos com alta expressão desse gene possuem um maior potencial de se diferenciar em osteoclastos¹⁵.

CTSK é uma protease altamente expressa por osteoclastos que induz a degradação do colágeno tipo 1 do tecido ósseo. Desempenha um importante papel no processo inicial da reabsorção óssea, e tem sido considerada um alvo potencial para o tratamento de doenças como a osteoporose, na qual a redução da reabsorção óssea é o principal objetivo terapêutico¹⁶.

Os mediadores inflamatórios, por sua vez, podem atuar de maneira direta e indireta no processo de osteoclastogênese. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pode aumentar o número de células precursoras de osteoclastos e a expressão de RANKL nestas células, além de diminuir a diferenciação de osteoblastos¹⁷. Interleucina 6 (IL-6), quando associado ao receptor de superfície (IL-6R) e a molécula adaptadora gp130 pode atuar sobre a osteoclastogênese, estimulando a formação de osteoclastos e induzindo a reabsorção óssea¹⁸. TNF- α e IL-6 estimulam

a diferenciação de osteoclastos de maneira sinérgica e regulam a osteoclastogênese tanto de forma indireta, estimulando células estromais a produzirem RANKL, como também agindo diretamente sobre os osteoclastos e seus precursores^{19,20}. Em cenários inflamatórios, IL-6 e TNF- α podem estimular a produção autócrina e parácrina de MMP-13, que encontra-se, portanto, hiperexpressa em diversas doenças inflamatórias. Além da atividade proteolítica destrutiva, degradando colágeno presente em tecidos mineralizados e não mineralizados, a MMP-13 pode agir diretamente sobre a formação e atividade dos osteoclastos, favorecendo o desenvolvimento de lesões osteolíticas²¹.

Em função da capacidade de alguns compostos bioativos, naturais e sintéticos, de modularem múltiplos alvos moleculares, especialmente relacionados à patogênese das doenças inflamatórias, estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de avaliar o potencial terapêutico de alguns destes compostos sobre as patologias ósseo inflamatórias^{22,23}.

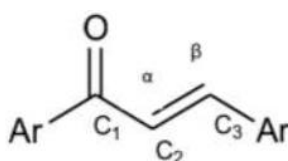
O uso de produtos naturais ativos como matéria-prima, ou molécula protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Cerca de 50% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado são elaborados com base em moléculas bioativas²⁴, e mais da metade das 150 drogas mais prescritas nos Estados Unidos nos últimos anos são derivadas de recursos naturais²⁵. O interesse das indústrias farmacêuticas pelos compostos naturais está direcionado, principalmente, para a seleção de moléculas líderes para desenho de novos medicamentos. O estudo destas moléculas torna possível a análise da relação estrutura-atividade e permite pequenas alterações em seu esqueleto com objetivo de torná-las mais efetivas. A modificação da estrutura química de uma molécula constitui-se uma das estratégias mais utilizadas para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos, uma vez que estas alterações podem melhorar suas propriedades físico-químicas e aumentar significativamente a potência e duração de seus efeitos biológicos.

1.2 Chalconas

As chalconas, um grupo de substâncias fenólicas derivadas de plantas, estão entre os compostos naturais que têm demonstrado potencial anti-reabsortivo. As chalconas são as responsáveis por conferir o pigmento amarelo de algumas plantas

e podem ser encontradas em raízes, frutos e sementes. Quimicamente, são moléculas de cadeia aberta que contêm dois anéis aromáticos ligados por um fragmento enona de três carbonos (Figura 1). Biologicamente, elas também podem ser definidas como uma classe de compostos pertencentes à família das fitoalexinas, produzidas durante a biossíntese de flavonóides.

Figura 1 – Estrutura fundamental das chalconas



Ar: Anel Aromático

Fonte: Elaboração própria

Além de mostrarem-se como uma fonte abundante para a obtenção de princípios ativos, as chalconas apresentam uma ampla variedade de propriedades biológicas, incluindo ação analgésica, antioxidante, antifúngica, antibacteriana²⁶, antimutagênica²⁷ e anti-inflamatória^{28,29}.

A estrutura química destes compostos permite modificações estruturais que podem alterar suas propriedades físico-químicas, aumentando a potência e duração de seus efeitos biológicos³⁰. Com este objetivo, de potencializar as propriedades farmacológicas das chalconas, diversos pesquisadores têm trabalhado na síntese e análise biológica de chalconas sintéticas, que além de apresentarem eficácia muitas vezes superior às chalconas naturais, não têm sido relacionadas à toxicidade *in vivo*³⁰.

Estudos avaliando os possíveis mecanismos biológicos envolvidos na ação antiosteoclastogênica das chalconas acreditam que sua atividade anti-inflamatória seja um dos principais mecanismos associados. As chalconas podem atuar sobre uma série de alvos do processo inflamatório, incluindo fatores de transcrição, moléculas de adesão, de sinalização intracelular e mediadores inflamatórios^{28,30} que são essenciais no processo de ativação e diferenciação dos osteoclastos, e dessa forma têm-se mostrado uma opção terapêutica interessante em doenças inflamatórias (e.g. doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, sepse)^{31,32} e patologias osteolíticas (câncer ósseo e osteoporose)³³⁻³⁵.

Derivados chalcônicos, como o Xanthohumol, têm demonstrado inibir a formação de células multinucleadas TRAP-positivas e das lacunas de reabsorção óssea induzidas por RANKL em macrófagos murinos (RAW 264.7), mostrando atuar tanto sobre a formação quanto sobre a atividade dos osteoclastos³⁶. Estes efeitos parecem ser mediados pela modulação da expressão gênica de TRAF6, ERK, PI3K, NFATc1 e c-Fos pelo composto, bem como de genes relacionados diretamente com os eventos reabsortivos (CTSK e MMP-9)³⁶.

O efeito anti-osteolítico das chalconas também tem sido observado in vivo. Em um modelo de reabsorção óssea induzida por RANKL, ratas ovariectomizadas foram

tratadas durante 5 semanas com injeção intraperitoneal (10mg/kg) diária de Xanthohumol, após aplicação de RANKL na calvária dos animais³⁷. A análise histomorfométrica da vértebra lombar mostrou que o volume ósseo e o número de trabéculas ósseas foram significativamente aumentados nas ratas tratadas com a chalcona, enquanto a distância entre as trabéculas foi diminuída. Coloração imuno-histoquímica dos cortes histológicos contendo amostras da calvária demonstrou que um menor número de células TRAP-positivas foi encontrado nos animais tratados com Xanthohumol, indicando que o composto pode reduzir a perda óssea e inibir a atividade osteoclástica in vivo³⁷.

Outros estudos avaliando o potencial das chalconas sobre a osteoclastogênese têm demonstrado que a modulação de NF- κ B por estes compostos tem um papel crítico neste processo regulatório³⁸. A ativação da via NF- κ B pode induzir a produção de genes que estimulam a diferenciação dos osteoclastos, favorecem sua sobrevivência e a reabsorção óssea, além de ativar os fatores de transcrição NFATc1 e c-Fos, que são essenciais para a diferenciação de osteoclastos³⁸.

Corroborando estes estudos, autores observaram que Cardamonin e Butein, compostos chalcônicos naturais, reduziram a osteoclastogênese em macrófagos (RAW 264.7) através da supressão de NF- κ B^{39,40}. RANKL é capaz de estimular a fosforilação e degradação da proteína inibitória kappa B (I κ B α), que uma vez degradado permite a translocação nuclear e ativação de NF- κ B. De acordo com os resultados encontrados, as chalconas inibiram a degradação de I κ B α , inibindo desta forma a ativação de NF- κ B^{39,40}.

Estudos avaliando a relevância de NF- κ B em doenças osteolíticas têm demonstrado que a ativação deste fator de transcrição não apenas aumenta a atividade de osteoclastos e a perda óssea, como também atua diminuindo a atividade de osteoblastos e a formação óssea^{38,41,42}. Embora haja ainda uma escassez de informações sobre os mecanismos de ação de NF- κ B sobre os osteoblastos, sabe-se que este fator de transcrição pode modular as principais células responsáveis pelo metabolismo ósseo (osteoblastos e osteoclastos), e este conhecimento tem incentivado a comunidade científica na busca por drogas que possam inibir a atividade de NF- κ B, como uma alternativa terapêutica para as doenças ósseas inflamatórias.

A habilidade das chalconas de modularem a via de sinalização MAPK (p38, ERK, JNK), também parece contribuir com seus efeitos inibitórios sobre a inflamação. As MAPK são um grupo de enzimas responsáveis pela transdução de diversos sinais extracelulares, e promovem a fosforilação dos aminoácidos treonina e serina em múltiplos substratos protéicos, incluindo outras enzimas, fatores de transcrição e proteínas ligantes ao RNA. Citocinas e mediadores inflamatórios endógenos, LPS e outros antígenos microbianos e fatores de crescimento são capazes de ativar as MAPKs. Além de exercerem papéis relevantes no desenvolvimento e homeostasia, um grande número de evidências pré-clínicas e clínicas confirmam seu papel crítico na inflamação e resposta imune e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças inflamatórias⁴³. Especificamente na osteoclastogênese, as MAPKs são capazes de modular a expressão de NFATc1 e c-Fos induzida por RANKL⁴⁴⁻⁴⁷, e sua inibição tem demonstrado reduzir a diferenciação e função dos osteoclastos⁴⁷. Macrófagos (RAW 264.7) estimulados com RANKL e tratados com Panduratin-A, um derivado chalcônico, apresentaram uma redução na expressão dos fatores de transcrição NFATc1 e c-Fos, bem como nos níveis de catepsina K, através da modulação de JNK, ERK e p-38, indicando o envolvimento das MAPKs nos efeitos inibitórios do composto sobre a osteoclastogênese⁴⁸.

Embora não haja evidências mostrando o envolvimento de outras vias de sinalização, como PI3K-Akt, no efeito das chalconas sobre a reabsorção inflamatória, é possível que o composto tenha alguma ação sobre a expressão destas proteínas intracelulares. Akt está diretamente envolvida na regulação da resposta inflamatória, atuando como inibidor da apoptose em neutrófilos⁴⁹,

macrófagos⁵⁰ e células dendríticas⁵¹, além de participar em outras funções biológicas destas células como a migração/quimiotaxia e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, existem evidências sugerindo um papel direto de Akt na diferenciação e função de osteoblastos e de um papel indireto na osteoclastogênese. A inibição da expressão gênica de Akt1 estimula a diferenciação de células estromais da medula óssea em osteoblastos, fenômeno associado ao aumento da expressão do fator de transcrição Runx2. Em animais geneticamente deficientes para Akt1, além da maior diferenciação osteoblástica, observa-se inibição de formação e atividade de osteoclastos, fenômeno correlacionado com a inibição da produção de citocinas RANKL e OPG, pelos osteoblastos^{52,53}. Desta forma, a ativação de Akt1 pode estar relacionada a menor formação e maior reabsorção óssea, sugerindo que a inibição seletiva de Akt1 pode ser uma estratégia terapêutica para diminuir a perda óssea/favorecer o ganho ósseo.

1.3 Chalconas Como Moduladoras do Turnover Ósseo na Periodontite

Periodontite é uma infecção crônica iniciada por biofilmes complexos que se formam sobre a superfície dentária. Substâncias liberadas por estes biofilmes, como o lipopolissacarídeo (LPS), antígenos e outros fatores de virulência, penetram no tecido gengival e iniciam uma resposta inflamatória, levando a ativação de células de defesa do hospedeiro. Como resultado da ativação celular, mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas coletivamente contribuem para a destruição tecidual e reabsorção óssea.

A resposta do hospedeiro frente ao desafio microbiano envolve uma complexa interação entre produtos bacterianos, populações celulares e mediadores inflamatórios. O LPS estimula os mastócitos a secretarem aminas vasoativas e a secreção de mediadores inflamatórios por células residentes do tecido gengival. Leucócitos secretam enzimas lisossomais, e em resposta ao aumento dos mediadores inflamatórios, há um aumento também no nível de metaloproteinases (MMPs) que degradam os tecidos gengivais. Linfócitos e macrófagos invadem o tecido. Células apresentadoras de antígeno ativam linfócitos T que podem aumentar ou diminuir a produção de mediadores inflamatórios⁵⁴. Citocinas e prostaglandina E2 (PGE₂) afetam a expressão de RANKL e osteoprotegerina (OPG), resultando na formação e ativação de osteoclastos que causam a reabsorção óssea inflamatória.

Um desequilíbrio no processo de formação e reabsorção óssea, através de mecanismos que incluem um aumento na diferenciação e atividade de osteoclastos, são observados na periodontite. Citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-17 e PGE₂ estão entre os mediadores inflamatórios relevantes na ativação de osteoclastos⁵⁵. No contexto das doenças periodontais, níveis elevados de RANKL e níveis reduzidos de OPG foram detectados no fluido gengival de pacientes com periodontite e a razão RANKL/OPG foi sugerida como um possível biomarcador para detecção de reabsorção óssea⁵⁶. IL-1 e TNF estimulam a osteoclastogênese e por consequência a reabsorção óssea⁵⁷. Citocinas inflamatórias como IL-1 β induzem a expressão de RANKL e OPG em diferentes tipos celulares, como osteoclastos, fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal^{58,59}, enquanto IL-6 induz a osteoclastogênese e estimula a reabsorção óssea.

Mediadores inflamatórios relacionados à osteoclastogênese, que podem ser modulados pelas chalconas, têm importante papel na patogênese das doenças periodontais. Neste contexto, o uso de compostos com virtual ausência de efeitos secundários e com propriedades imuno-modulatórias, como as chalconas, pode representar um benefício relevante no tratamento das doenças periodontais.

Dados de experimentos preliminares realizados pelo nosso grupo avaliando o efeito de uma chalcona sintetizada pelo colaborador deste projeto, Chalcona T4, corroboram aqueles encontrados na literatura, demonstrando o potencial anti-inflamatório dos compostos chalcônicos. RAW 264.7 foram estimuladas com LPS de *Escherichia coli* (*E. Coli*) e tratadas com diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona T4 por 24h. A expressão em nível de mRNA de IL-6, MMP-13 e TNF- α foi avaliada. Os resultados mostraram que a chalcona T4 foi capaz de reduzir significativamente a expressão dos genes inflamatórios, mesmo quando utilizada em concentrações tão baixas quanto 1 μ M; e quando utilizada em concentrações maiores (10 μ M) reduziu a expressão de IL-6 e MMP-13 a níveis inferiores ao controle. Estes mediadores foram avaliados por estarem intimamente relacionados à patogênese das doenças periodontais, e terem participação ativa no processo de osteoclastogênese.

Além do efeito supressivo sobre a expressão dos genes pró-inflamatórios, a chalcona T4 destaca-se entre outros compostos chalcônicos pela potência dos seus efeitos, uma vez que mais de 50% dos níveis de mRNA dos genes avaliados foram reduzidos após tratamento das células com 1 μ M do composto. Este resultado é

superior a outros encontrados na literatura, em que diferentes derivados chalcônicos foram avaliados sobre a expressão gênica de mediadores inflamatórios^{60,61}.

Considerando os resultados preliminares apresentados demonstrando a efetividade da chalcona T4 na modulação de mediadores inflamatórios relevantes na inflamação e osteoclastogênese, este estudo tem como objetivo identificar um novo agente anti-inflamatório e anti-reabsortivo com potencial na modulação do *turnover* ósseo associado à doença periodontal, e investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos em seus efeitos sobre a osteoclastogênese.

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo nos permitem concluir que a administração sistêmica da chalcona T4 além de segura, é efetiva na redução da perda óssea alveolar experimentalmente induzida in vivo. Seus efeitos anti-reabsortivos foram associados a modulação negativa de TNF- α e NF- κ B, e à redução de células inflamatórias nos tecidos gengivais. Resultados do estudo in vitro corroboraram o potencial anti-osteolítico do composto demonstrando o potencial da chalcona na inibição tanto da formação quanto da atividade dos osteoclastos. Modulação de mediadores (tais como Trap, Mmp-9, Ctsk e Oscar), e de vias de sinalização intracelular (ERK e AKT) relevantes na osteoclastogênese, estão implicados nos efeitos biológicos observados.

REFERÊNCIAS*

1. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005; 6(12): 1191-97.
2. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2010; 11: 219-227.
3. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nat.* 2013; 423: 337-342.
4. Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, et al. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1068: 180-186.
5. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 292-304.
6. Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo KI, et al. Molecular analysis of RANKL-independent cell fusion of osteoclast like cells induced by TNF-alpha, lipopolysaccharide, or peptidoglycan. *J. Cell. Biochem.* 2007; 101: 122-134.
7. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nat.* 2003; 423: 337-342.
8. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4: 638-649.
9. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 2000; 15: 1477-88.
10. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* 2002; 3: 889-901.
11. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem.* 2004; 279: 45969-79.
12. Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Lee SH, Fisher DE, et al. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35209-16.
13. Kim Y, Sato K, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32905-13.

* 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>

14. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med*. 2002; 195: 201-9.
15. Herman S, Muller RB, Kronke G, Zwerina J, Redlich K, Hueber AJ, et al. Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 3041-50.
16. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2011; 7: 447-456.
17. Zha B. TNF and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 2017; 15: 126-134.
18. Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev*. 2009; 8: 538-542.
19. Herman S, Kronke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med*. 2008; 14: 245-53.
20. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*. 1990; 145: 3297-303.
21. Fu J, Li S, Feng R, Ma H, Sabeh F, Roodman GD, Wang J, et al. Multiple myelomaderived MMP-13 mediates osteoclast fusogenesis and osteolytic disease. *J Clin Invest*. 2016; 126: 1759-72.
22. Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res*. 2011; 46: 269-79.
23. Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun*. 2012; 18: 155-63.
24. Sccaro Junior NL. Desafios da Bioprospecção no Brasil. Brasília. IPEA; 2011.
25. Grifo F, Rosenthal J. The origins of prescription drugs. Island Press. 1997; 131-163.
26. Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26: 3508-13.
27. Ban HS, Suzuki K, Lim SS, Jung SH, Lee S, Ji J, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67: 1549-57.
28. Hsieh HK, Lee TH, Wang JP, Wang JJ, Lin CN. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. *Pharm Res*. 1998; 15: 39-46.
29. Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11: 295-309.
30. Batovska D, Todorov T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr Clin Pharmacol*. 2010; 5: 1-29.

31. Chen X, Cai X, Le R, Zhang M, Gu X, Shen F, et al. Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 496: 245-252.
32. Zheng W, Zhang H, Jin Y, Wang Q, Chen L, Feng Z et al. Butein inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017; 42: 1-10.
33. Maurya SW, De K, Singh KB, Rai R, Siddiqui IR, Singh D, Maurya R. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic analogues of pregnenolone as novel anti-osteoporotic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017; 27: 1390-96.
34. Almelah E, Smith DP, McGown A, Aziz A, Potgieter HJ, Ragazzon P. Dibenzoyl-methane Derivatives as a Potential and Exciting New Therapy for the Treatment of Childhood Bone Cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36: 6043-50.
35. Silva G, Marins M, Fachin AL, Lee SH, Baek SJ. Anti-cancer activity of transchalcone in osteosarcoma: involvement of Sp1 and p53. *Mol Carcinog*. 2016; 55: 1438-48.
36. Kwang SS, Sang YR, Young SK, Young SL, Eun MC. Xanthohumol modulates the expression of osteoclast-specific genes during osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Food Chem Toxicol*. 2013; 62: 99-106.
37. Li J, Zeng L, Xie J, Yue Z, Deng H, Ma X, et al. Inhibition of osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and in vivo by a prenylflavonoid xanthohumol from hops. *Sci Rep*. 2015; 5: 17605.
38. Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, Wang CY. Novel functions for NF κ B: inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol*. 2020; 6: 607-11.
39. Sung B, Prasad S, Yadav VR, Gupta SC, Reuter S, Yamamoto N et al. RANKL signaling and osteoclastogenesis is negatively regulated by cardamonin. *BB.PLoS One*. 2013; 8(5): e64118.
40. Sung B, Cho SG, Liu M, Aggarwal BB. Butein, a tetrahydroxychalcone, suppresses cancer-induced osteoclastogenesis through inhibition of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand signaling. *Int J Cancer*. 2011; 129: 2062-72.
41. Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor- κ B. *Nat Med*. 2009; 15: 682–89.
42. Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2006; 281: 4326-33.
43. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?. *Clin Exp Immunol*. 2009; 158: 272-80.
44. Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 99-105.
45. Zwerina J, Hayer S, Redlich K, Bobacz K, Kollias G, Smolen JS, et al. Activation of p38 MAPK is a key step in tumor necrosis factor-mediated inflammatory bone destruction. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 463-472.

46. Liao JC, Wei ZX, Zhao C, Ma ZP, Cai DZ. Inhibition of osteoclastogenesis for periprosthetic osteolysis therapy through the suppression of p38 signaling by fraxetin. *Int J Mol Med*. 2018; 42(3): 1257-64.
47. L Chang, M Karin. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nat*. 2001; 410: 37-40.
48. Kim H, Kim MB, Kim C, Hwang JK. Inhibitory effects of Panduratin A on periodontitis-induced inflammation and osteoclastogenesis through Inhibition of MAPK Pathways in vitro. *J Microbiol Biotechnol*. 2018; 28: 190-198.
49. Jia Y, Loison F, Hattori H, Li Y, Erneux C, Park SY, et al. Inositol trisphosphate 3-kinase B (InsP3KB) as a physiological modulator of myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 4739-44.
50. Boronkai A, Bellyei S, Szigeti A, Pozsgai E , Bogнар Z, Sumegi B, et al. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. *Eur J Cell Biol*. 2009; 88: 753-63.
51. L van de Laar , A van den Bosch , A Boonstra, RS Binda , M Buitenhuis, HL Janssen, et al. PI3K-PKB hyperactivation augments human plasmacytoid dendritic cell development and function. *Blood*. 2012; 120: 4982-91.
52. Yang FC, Chen S, Robling AG, Yu X, Nebesio TD, Yan J, et al. Hyperactivation of p21ras and PI3K cooperate to alter murine and human neurofibromatosis type 1-haploinsufficient osteoclast functions. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2880-91.
53. Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development. *Mol Cell Biol*. 2012; 32: 490-500.
54. Murakami T. Understanding and treatment strategy of the pathogenesis of periodontal disease based on chronic inflammation. *Clin Calcium*. 2016; 26(5): 766-72.
55. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41: 1361-66.
56. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(11): 44-48.
57. Pfeilschifter J, Schwarzenbach H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett*. 1990; 273: 185-7.
58. Hormdee D, Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Kobayashi H, Koshy G, et al. Protein kinase-A dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 2005; 142: 490-497.
59. Brechter AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(3): 910-23.
60. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?. *Clin Exp Immunol*. 2009; 158: 272-80.

61. Sung B, Prasad S, Yadav VR, Gupta SC, Reuter S, Yamamoto N et al. RANKL signaling and osteoclastogenesis is negatively regulated by cardamonin, PLoS One. 2013; 8(5): e64118.
62. Karimi-Sales E, Jeddi S, Ghaffari-Nasab A, Salimi M, Alipour MR. Effect of trans-chalcone on hepatic IL-8 through the regulation of miR-451 in male rats. Endocr Regul. 2018; 52: 1-5.
63. Wankhede S, Kum N, Simon L, Biswas S, Gourishetti K, Ramalingayya GV, et al. Evaluation of in vitro and in vivo anticancer potential of two 5-acetamido chalcones against breast cancer. Excli J. 2017; 16: 1150-63.
64. Ma Q, Ruan YY, Xu H, Shi XM, Wang ZX, Hu YL. Safflower yellow reduces lipid peroxidation, neuropathology, tau phosphorylation and ameliorates amyloid β - induced impairment of learning and memory in rats. Biomed Pharmacother. 2015; 76: 153-64.
65. Mus LM, Denecker G, Speleman F, Roman BI. Vehicle development, pharmacokinetics and toxicity of the anti-invasive agent 4-fluoro-3',4',5'- trimethoxychalcone in rodents. PLoS One. 2018; 13(2): e0192548.
66. Nguyen DH, Zhou T, Shu J, Mao JH. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. Cancer InCytes. 2013; 2(1):e
67. Zambrano LMG, Brandao DA, Rocha FRG, Marsiglio RP, Longo IB, Primo FL, et al. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. Sci Rep. 2018; 27: 6652.
68. Duarte PM, Goncalves P, Casati MZ, S de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth supporting alveolar bone: a histometric study in rats. J Periodontal Res. 2006; 41(6): 541-6.
69. De Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. Arch Oral Biol. 2009; 54: 609-17.
70. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. Life Sci. 2009; 84: 745-54.