

RESSALVA

Atendendo solicitação do autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/03/2026.



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-q PCR).....	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, conseqüentemente, 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.

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. Boukourt 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, TNF α 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- α . *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 Faloni 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. Seriola 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.