



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 - Proteíno-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 - Fosfoinositídeo 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}.

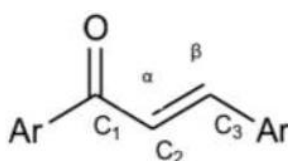
O uso de produtos naturais ativos como matéria-prima, ou molécula protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Cerca de 50% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado são elaborados com base em moléculas 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.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

A hipótese deste trabalho é que a chalcona é capaz de reduzir a reabsorção óssea e a inflamação em um modelo de periodontite experimental, e que este efeito envolve a modulação de mediadores biológicos críticos na osteoclastogênese. Desta forma, o objetivo geral deste estudo é avaliar o potencial anti-inflamatório e anti-reabsortivo da Chalcona T4, com potencial na modulação do *turnover* ósseo associado à periodontite, e investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos em seus efeitos sobre a osteoclastogênese. Para esta finalidade, os objetivos específicos estão assim definidos:

2.2 Objetivos Específicos

(i) Avaliar in vivo o potencial anti-inflamatório e anti-reabsortivo da chalcona T4: O modelo experimental de indução da periodontite por ligaduras em ratos foi utilizado para avaliação dos seguintes desfechos: extensão da perda óssea; imunolocalização e quantificação dos leucócitos (CD45) presentes nos tecidos gengivais, bem como dos fatores de transcrição NFATc1 e NF- κ B; detecção dos níveis de TNF- α ; quantificação dos componentes celulares (infiltrado celular, fibras colágenas e vasos sanguíneos); ativação da via de sinalização p38 MAPK, e análise microbiológica das ligaduras para a presença de *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

(ii) Investigar os mecanismos biológicos da chalcona sobre a osteoclastogênese in vitro: Para este objetivo as células RAW 264.7 foram estimuladas com RANKL e tratadas com doses não citotóxicas da chalcona para avaliação dos seguintes desfechos: determinar seus efeitos sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos; avaliar o efeito da chalcona sobre a expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea (*Oscar*, *Trap*, *Nfatc1*, *Mmp-9* e *Ctsk*), e seu impacto sobre a ativação das vias de sinalização NF- κ B, p38 MAPK, ERK e AKT.

3 PUBLICAÇÃO

Chalcone T4, a novel chalconic compound, inhibits inflammatory bone reabsorption in vivo and suppresses osteoclastogenesis in vitro.

Natalie Ap. Rodrigues Fernandes¹, Angelo Constantino Camilli¹, Laura Andrea Gonzalez Maldonado¹, Rafael Molon¹, Cindy Grace Pérez Pacheco¹, Amanda Favoreto Silva¹, Luiz Carlos Spolidorio², Luis Octavio Regasini³, Carlos Rossa Junior¹, Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili¹

1- Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

2- Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

3- Department of Chemistry and Environmental Chemistry, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding Author:

Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, DDS, PhD
Department of Diagnosis and Surgery
School of Dentistry at Araraquara – Univ. Estadual Paulista (UNESP)
Rua Humaitá, 1680 – Centro
14801-903 Araraquara – SP BRAZIL
e-mail: morgana.guimaraes@unesp.br
phone: +55 (16) 3301-6374 Fax: +55 (16) 3301-6433

* O artigo segue as normas do periódico Journal of Periodontology.

Abstract

Background: Chalcones, a group of flavonoids derivate from plants, has displayed anti-inflammatory and anti-resorptive potential. Synthetic analogues of chalcones have been investigated as therapeutic agents because of its enhanced biological and pharmacological effects. The aim of this study was to assess the effect of a novel chalcone, Chalcone T4, on bone reabsorption and inflammation in vivo, and on differentiation and activity of osteoclasts in vitro.

Methods: In vivo, ligatures were placed around the first molar of rats (n=40) to induce periodontitis. Chalcone T4 (5 mg/kg and 50 mg/kg body weight) or vehicle (0.5% carboxymethylcellulose) were administered daily to animals for 15 days by intragastric gavage. After 15 days, hemimaxillae and gingival tissues were harvested. Outcomes assessed were bone resorption (microcomputed tomography) (μ CT), levels of TNF- α expression in the gingival tissue (ELISA), cellular infiltrate and collagen content (stereometric analysis), expression of CD45+ cells, NFATc1 and NF-kB (immunohistochemical), and activation of p38 MAPK signaling pathway (Western Blot). In vitro, macrophages (RAW 264.7) were treated with different concentrations of chalcone T4 (1, 2.5, 5 and 10 μ M) and stimulated with RANKL for 6 days. Osteoclast activity and differentiation (actin ring staining) were evaluated.

Results: In vivo, chalcone T4 prevented bone resorption, reduced cellular infiltrate and increased the collagen content in the gingival tissues. Chalcone-treated animals also had lower levels of TNF- α and reduced expression of NF-kB and CD45. P38 activation was not modulated by compound. In vitro, chalcone T4 inhibited osteoclast differentiation and activity.

Conclusion: Chalcone T4 administered orally inhibited alveolar bone resorption and inflammation associated with the experimental periodontitis in vivo and osteoclastogenesis in vitro, suggesting a therapeutic role for this compound in the treatment of this condition and in other osteolytic pathologies. The results presented by the compound are superior to the data presented by other chalcones, showing the robustness of its biological effects.

Key words: chalcone, bone resorption, inflammation, macrophages, periodontal disease, osteoclasts, rats.

INTRODUCTION

Periodontal disease is characterized by chronic inflammation of the periodontium that compromises both mineralized tissue and soft tissue around the teeth. Bacterial pathogens initiate a local inflammatory response, which stimulates the innate immune system and can progress through periodontal tissues by the action of cytokines and biological mediators. The inflammatory response then drives the destruction of the alveolar bone through the increased number and activity of osteoclasts¹.

Osteoclasts are multinucleated giant cells, originated from hematopoietic precursors whose differentiation process involves a series of steps, such as the differentiation of tartrate-resistant acid phosphatase cells (TRAP), fusion to form multinucleated cells, activation of bone resorption and spontaneous apoptosis². This differentiation process is mainly induced by RANKL, which mediates osteoclastogenesis through its binding to the RANK receptor present in precursor cells, and by M-CSF, which transmits signals of survival and proliferation to pre-osteoclastic cells³. The binding of RANKL to its RANK receptor induces a signaling cascade that involves the recruitment of TRAF6 and various downstream pathways, such as NF- κ B and MAPKs (including p38 MAPK, ERK and JNK)⁴. These signaling pathways lead to the activation of NFATc1 which then induces the expression of several genes related to the osteoclast formation and activity⁵.

TNF also plays a major role in this process, mostly in synergy with RANKL⁶, increasing osteoclast precursors, as well as indirectly increasing osteoclastogenesis through augmentation of RANK expression on osteoclast precursors, and RANKL expression in stromal cells^{7,8}.

An excessive increase in the differentiation and activity of osteoclasts is one of the key factors in the pathogenesis of several metabolic bone diseases, such as rheumatoid arthritis, osteoporosis, Paget's disease, multiple myelomas and periodontal diseases, and the reduction of these cellular events through the modulation of cytokines, transcription factors and intracellular signaling pathways involved in osteoclastogenesis is essential for the development of treatment strategies for these pathologies. In recent years, great progress has been made in the treatment of these disorders, such as estrogen replacement therapy⁹, the use of bisphosphonates and specific cytokine inhibitors (RANKL, TNF- α , IL-6)¹⁰; but the

options are still few and are related to the appearance of significant side effects¹¹⁻¹³ and, therefore, have not been indicated for long-term treatments¹⁴.

In this context, natural products or synthetic compounds based on natural products have aroused great interest due to their biological activities and virtual absence of toxicity.

Chalcones, a group of phenolic compounds derivate from plants, has displayed a wide spectrum of biological activities, as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and anti-resorptive. In view of its numerous biological effects, chalcones have been the target of diverse clinical and pre-clinical research for the treatment of inflammatory diseases (e.g., inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis, sepsis)¹⁵⁻¹⁹ and osteolytic pathologies (bone cancer and osteoporosis)²⁰⁻²².

Studies evaluating the possible biological mechanisms involved in the anti-resorptive effect of chalcone have shown that its anti-inflammatory activity is one of the main associated mechanisms. Chalcones can act on a number of targets of the inflammatory process, including transcription factors, adhesion molecules, intracellular signaling and inflammatory mediators²³⁻²⁶ that are essential in the process of osteoclast activation and differentiation. Among its various molecular targets, the modulation of NF- κ B by chalcone seems to be particularly relevant since most of the biological effects of the compound include the inhibition of this transcription factor.

In addition to the diverse biological activities and absence toxicity, chalcones have been highlighted because they present a simple molecular structure, which allows changes able to significantly increase the potency and duration of its biological effects²⁷. With this strategy in mind, to increase the potency of its biological effects, a series of chalconic compounds have been synthesized. We have assessed the anti-inflammatory potential of some new compounds and identified a 'lead' compound. Preliminary studies showed that low doses of this new compound, Chalcone T4, completely inhibited the expression of pro-inflammatory mediators (IL-6, Mmp-13, TNF- α) induced by LPS in vitro studies (data not shown). In addition to the suppressive effect on the expression of pro-inflammatory genes, chalcone T4 stands out among other chalconic compounds due to the potency of its effects, since the compound reduced the mRNA levels of evaluated genes by more than 50% after treatment cells with 1 μ M of the compound. This result is superior to others found in

the literature, in which different chalconic derivatives were evaluated on the gene expression of inflammatory mediators^{28,29}.

Considering the effectiveness of this new compound in reducing the expression of mediators related to bone resorption, and the anti-resorptive potential of chalcones reported in the literature, the objective of this study is to evaluate, for the first time, the effect of chalcone T4 on inflammatory bone resorption associated with periodontal disease and to investigate some of the molecular mechanisms of the compound in osteoclastogenesis.

MATERIALS AND METHODS

In vivo study

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Use (CEUA) of the School of Dentistry at Araraquara – UNESP (permit number: 18/2018) and performed in accordance with the guidelines from the National Council for Animal Experiment Control (CONCEA). Eighteen male Swiss mice, weighing between 25 to 30 g, were used in the toxicity study, and forty Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*, *Holtzman*), weighing 140 to 160 g were used in subsequent study. Animals were maintained in the animal facility of the School of Dentistry at Araraquara - UNESP with similar conditions (4 animals/cage) and standardized conditions of temperature and humidity (22 °C ± 1 °C, 65-70%), 12 h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*.

Chalcone

Chalcone T4 synthesized in the Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP) at São José do Rio Preto. The synthesis of the substance was carried out by means of the Claisen-Schmidt condensation reaction. The structure of the compound was identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance techniques of hydrogen and carbon thirteen (¹H NMR and ¹³C NMR). The purity of the substance was determined by high performance liquid chromatography analysis with detection by photodiodes array (CLAE-DAD), showing values equal to or greater than 95.0%. The compound was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC).

Preliminary study – toxicity study and Experimental design

Studies have shown that oral administration of chalcones is well-tolerated and do not cause toxicity at doses up to 300 mg/kg³⁰⁻³³. However, this is the first study to evaluate the effects of systemic administration of chalcone T4, therefore we performed an in vivo toxicity experiment prior to subsequent studies.

Chalcone T4 was administered daily to animals for 15 days by intragastric gavage, following treatments groups (n=3): control (distilled water), 0.5% CMC (vehicle), chalcone T4 5 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg body weight. Mortality and behavioral changes were checked, and body weight was recorded daily. Animals were euthanized after 15 days by cervical dislocation under general anesthesia. At the time of euthanasia, blood was collected by cardiac puncture for biochemical analysis, and liver, kidney and stomach were removed from the animals and submitted to routine histological processing for histopathological analyses.

Histopathological and Biochemical analysis

The histopathological analysis was performed to assess the presence of tissue alterations that indicate signs of toxicity (inflammatory process, vasculature volumetric change, necrosis and/or ulceration). Three semi-serial sections of 3 μ M thickness were obtained from each organ from all the animals in each group and stained with hematoxylin and eosin (H/E). Images were obtained in a conventional optical microscope using standardized settings for image acquisition (Leica Application Suite 3.8, Wetzlar, Germany) at 200x magnification. The histopathological characteristics of the tissues were evaluated by a trained examiner blinded to the experimental groups.

For biochemical analyzes, blood was collected from animals by cardiac puncture at the time of euthanasia, used to assess the level of glutamic-oxalacetic transaminase (TGO) and glutamic-pyruvic transaminase (TGP), indicative of liver damage, and Lactate dehydrogenase (LDH), overexpressed in inflammatory conditions.

Ligature-induced periodontitis and Experimental design

To assess the effect of chalcone on inflammatory bone resorption in an experimental periodontal disease model, periodontitis was induced by ligature (cotton threads) placement around the lower first molars bilaterally, under general anesthesia by intramuscular administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (7 mg/kg). The animals (n=40) were randomly assigned to the following five experimental groups (n = 8 animals/group): negative control (no ligatures placement and no treatment), positive control (ligatures placement and no treatment), 0.5% CMC (ligatures and chalcone vehicle), chalcone T4 5 mg/kg (ligature) and chalcone T4 50 mg/kg (ligature).

Administration of chalcone started in the same day of ligatures placement. Chalcone was administered daily intragastrically by gavage in two different doses (the two lowest non-cytotoxic doses evaluated in the preliminary study): 5 and 50 mg/Kg/body/weight. Fifteen days after the placement of ligatures the animals were euthanized by lethal overdose of anesthetic at the end of the protocol and the mandibles were divided into two hemimandibles. Gingival soft tissues around the ligature from the right hemimandible were dissected and processed for molecular analyzes (ELISA and Western Blot). The right hemimandible were fixed with 4% paraformaldehyde for 18 hours and transferred to 70% ethanol for microcomputer tomography (μ CT) scanning and methylene blue dye staining. The left hemimandible were submitted to routine processing (fixed with 4% paraformaldehyde and then decalcified in 0.5% EDTA, pH 7.2) for paraffin embedding and used in histological and immunohistochemical analysis.

Alveolar bone resorption - methylene blue dye staining

Hemimandible were removed from 70% ethanol, immersed for 3 hours in hydrogen peroxide and cleaned by gentle rubbing with gauze pads to remove the remaining soft tissue. Then the pieces were immersed for 2 minutes in a solution containing 3.5 mg/ml of methylene blue dye. Images of the vestibular face of the pieces were captured in a stereomicroscope (Leica HZ6 - 1.25x magnification) and the entire root of the lower first molar was considered to measure the region between the enamel-cement junction and the alveolar bone. The entire area of the exposed root surface was measured using the ImageJ (NIH Image) program, by a single

examiner, who was not aware of the experimental group allocation of the specimens. The results are representative of 8 animals (hemimandible) per group.

Alveolar bone resorption— microcomputed tomography (μ CT)

The mandibles were carefully dissected, fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h, and stored in 70% ethanol until scanned on a micro-CT imaging system (Skyscan 1076; Bruker, Kontich, Belgium). Mandibles were scanned using 9 μ m (0.01 mm) isotropic spatial resolution, 0.5 mm aluminum filter, 80 kV voltage, 310 μ A current, 195 ms exposure, frame averaging of 03, and rotation step 0.4° across 180°. For reconstruction (NRecon 1.6.1.5; Bruker), the following parameters were used: ring artifact correction, 4; pixel defect mask, 5%; smoothing, 1%; beam hardening correction, 26%, and compressed sensing (CS) to image conversion, 0.0–0.8. A standardized region of interest (ROI) was defined in a sagittal orientation in the furcation area of the first mandibular molar extending from the top of furcation to the root apices. This ROI was delimited every ten planes extending 90 slices. The fraction volume of ROI occupied by mineralized tissue (bone fraction volume (BVf)) was quantified. A blinded and experienced examiner performed all the micro-CT measurements.

ELISA – TNF- α protein expression

Total proteins were extracted from gingival tissue, removed at the time of euthanasia, using an extraction buffer supplemented with a protease inhibitors cocktail. The tissue samples were macerated in the buffer and centrifuged for 5 min at 13.000 rpm at 4°C. The proteins were quantified using the Bradford assay and a total of 40 μ g of total protein were used to perform the ELISA according to the manufacturer's instructions. The results are representative of 6 animals per group.

Stereometric analysis

The stereometric analysis was performed using an optical microscope coupled to a color digital camera (LEICA DM2500 – 200x magnification) and standardized settings for image acquisition. A total of 3 semi-serial sections (4 μ m tick) obtained in the sagittal plane and stained with H/E were assessed for each hemimandible from at least four animals of each experimental group. A 154 points grid was overlaid on the

region of interest and the proportion of each tissue component (cellular infiltrate, collagen fibers and blood vessels) was performed in relation to the total number of points counted. The region of interest was defined as follows: connective tissue located between the first and second molars, delimited coronally by the most apical portion of the epithelial tissue; apically through the top of the bony crest; and laterally through the most prominent region of the distal root of the first molar. The measurements were performed using ImageJ software (v. 1.51 s, National Institutes of Health, USA – <http://imagej.nih.gov/ij>).

Immunohistochemical analysis

CD45, NFATc1 and NF- κ B expression was detected in the gingival tissues by immunohistochemical analysis. A total of 3 semi-serial sections (4 μ M tick) from five different animals from each experimental condition were analyzed. The sections were deparaffinized in xylol, rehydrated and subsequently incubated for 5 minutes with 3% hydrogen peroxide solution to block endogenous peroxidase. For the antigenic recovery step, the sections that received the antibody for NFATc1 and CD45 were submerged in a kit solution (Target retrieval solution high pH) in a pressure for 3 min at 94-96°C and then left on the bench for cooling at room temperature for 20 min; the sections that received the antibody for NF- κ B were submitted to antigenic recovery with 0.05% trypsin for 10 min at 37°C, and remained for another 10 minutes for cooling on the bench. Then the slices were incubated with the primary antibodies and left for 18h ('overnight') at 4°C in a humidified compartment. Subsequently, the sections were incubated with secondary antibody conjugated to peroxidase (Dako EnVision TM FLEX / HRP detection reagent), provided by the kit, and the reaction was revealed using the DAB chromogen. All sections were counterstained with Carrazi's hematoxylin and mounted with Permount. Photomicrographs were obtained of the region of interest (the same as described in the stereometric analysis; however, it extended apically to the median region of the alveolar bone crest) with 200x magnification. The determination of the intensity and area of chromogen staining were performed as quantitative analysis, according Nguyen et al³⁴. A blind examiner to the experimental conditions performed these measurements using ImageJ software (v. 1.51 s, National Institutes of Health, USA – <http://imagej.nih.gov/ij>).

Western Blot

Western Blot was performed to assess the effects of Chalcone T4 on the phosphorylation of the p38 MAPK intracellular signaling pathway. Total proteins were extracted from periodontal tissues as previously described in this section. The tissues samples were macerated, centrifuged for 5 minutes at 13,000 RPM at 4°C, with subsequent removal of the supernatant. A total of 40 µg of total protein were used per sample. The samples were separated in 10% Tris-Cl polyacrylamide gels (resolving gel) and 4% (stacking gel) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% BSA buffer in TBS containing 1% Tween-20 (TBS-T) and then incubated with the primary antibody (p-p38 or p38) overnight. After incubation with secondary antibody, the detection of the presence of the protein was performed by chemiluminescence reaction and visualized in a digital documentation system. The results were obtained by densitometric analysis of the bands and normalized through the ratio between the non-phosphorylated and phosphorylated form of the target protein.

In vitro study

Osteoclast differentiation and activity in vitro

To assess the effects of the different concentrations of Chalcone T4 on osteoclast differentiation and activity, we used RAW 264.7 cell line of murine macrophage. The cells were cultured in α -MEM medium supplemented with penicillin/streptomycin and heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, 10% v:v). Viability of cells was analyzed using MTT assay with absorbance measurement at 490 nm in a microplate reader. The number of viable cells in wells treated with chalcone was estimated in relation to the control group (untreated cells) and used if >80% of the cells were viable (data available in supplementary Figure 3 in online *Journal of Periodontology*). Cells were seeded at a concentration of 2×10^3 cells per well in the presence of RANKL (100 ng/ml) to induce differentiation of macrophages in osteoclast. Different non-cytotoxic concentrations of chalcone T4 (1, 2.5, 5 e 10 µM) were added to the well 30 min prior to RANKL stimulation. Medium was changed and these stimuli re-applied every 48 hours. Osteoclasts (cells with 3 or more nuclei) were usually detected around 3 or 4 days after RANKL treatment. In cell

differentiation experiment, at day 6 the cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized in saponin-containing buffer and stained with AlexaFluor 488-conjugated phalloidin for 40 min, followed by DNA staining with DAPI for 5 min for the identification of actin ring formation. In cell activity experiment, cells were seeded on calcium phosphate-coated 96-well plates, treated with chalcone and stimulated with RANKL, as described. At 6 day the cells were lysed by incubation in 1% sodium hypochlorite for 5 min. Digital images from the whole wells were obtained of phalloidin/DAPI-stained and of calcium-phosphate coated plates at 10x magnification on an inverted digital fluorescence microscope. In cell differentiation experiment, the number of osteoclasts was counted over the entire length of the well and the data compared among groups. In cell activity experiment the area of exposed plastic was measured as indicative of resorbing activity. A blind examiner to the experimental conditions performed these measurements using ImageJ software (v. 1.51 s, National Institutes of Health, USA – <http://imagej.nih.gov/ij>).

Statistical analysis

Data obtained from each experiment were analyzed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ind., San Diego, CA, USA). The objective of the analysis was to compare the results of each outcome according to the different doses and concentrations of Chalcone T4 using ANOVA with post-hoc Tukey test for pairwise comparisons. Significance level was set at 95% ($p < 0.05$) in all analysis.

RESULTS

In vivo experiment

No untoward physical or behavioral effects, including weight loss (supplementary Fig. 1A and Fig. 2) was observed throughout the experimental period. Histopathological analysis of the kidney, stomach and liver in the preliminary study demonstrated an aspect of normality, with no tissue alterations that indicate signs of toxicity, regardless of dose administered. We also did not find any significant difference in the levels of TGO, TGP and LHD between the experimental groups and the control group, confirming the absence of toxicity (supplementary Fig. 1B and Fig. 1C).

Macroscopic bidimensional analysis by methylene blue dye staining demonstrated that 5 mg/kg dose of systemically administered Chalcone T4 significantly ($p < 0.0001$) reduced inflammatory bone resorption in comparison with positive control group (Fig. 1A). Increased bone volume fraction in the groups treated with 5mg / kg of chalcone, in relation to the positive control group, corroborated this result (Fig. 1B).

Protein levels of the proinflammatory cytokine TNF- α was markedly reduced ($p < 0.05$) in the gingival tissues of the animals treated with 5 mg/kg dose of Chalcone T4 in comparison with the positive control group (Fig. 2). Parallely, stereometric analysis showed a significant reduction ($p < 0.0002$) of cellular infiltrate for the 5 mg/kg and 50 mg/kg doses, and an increase of collagen content ($p < 0.0002$) for the 5 mg/kg dose of Chalcone T4 compared to the positive control (Fig. 3).

Consistent with the effect on inflammatory mediators and bone resorption, there was a statistically significant decrease on NF-kB p65 and CD45 expression by immunohistochemistry for 5 mg/kg dose of Chalcone T4 compared with the positive control group ($p < 0.005$) (Fig. 4). Interestingly, the data displayed a reduction ($p < 0.02$) on p38 phosphorylation in the positive control (animals with ligatures) compared to the negative control (animals with no ligatures) by Western Blot (Fig. 5).

In vitro experiment

Chalcone T4 treatment of murine macrophages inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation and activity in vitro, corroborating the anti-resorptive effect of the compound observed in vivo. A concentration-dependent effect was observed. All chalcone concentrations evaluated significantly reduced osteoclast activity and differentiation, except the lowest concentration. 1 μ M of chalcone T4 was not able to reduce the number of osteoclasts, however, it reduced its diameter in relation to osteoclasts stimulated with RANKL (untreated). 5 μ M and 10 μ M of chalcone reduced the area of bone resorption to values as low as cells not stimulated with RANKL (control), demonstrating the potency of the compound as an inhibitor of osteoclastic activity (Fig. 6).

DISCUSSION

The use of active natural products as prototype molecule for the synthesis of more potent and selective analogs has contributed significantly to the development of therapeutic agents. About a third of FDA-approved drugs over the past 20 years are based on natural products or their derivatives^{35,36}. The modification of the chemical structure of a molecule is one of the most used strategies for obtaining pharmacologically active compounds, since these changes can improve its physical-chemical properties and significantly increase the potency and duration of its biological effects.

Albeit the effects of chalcones have been reported in many models of inflammatory disease, it is the first study to evaluate the effects of a synthetic chalcone, based on its natural analogue, in a periodontal disease model, as well as the first study to evaluate the Chalcone T4. Oral administration of 5 mg / kg of Chalcone T4 significantly decreased the inflammatory bone resorption, increased collagen content and inhibited the local inflammatory response in the ligature-induced periodontitis model in rats, which was associated with a significant reduction on the number of infiltrating inflammatory cells (CD45+) and inflammatory mediators (TNF- α). Activation of NF-kB in the gingival tissues was also attenuated in animals chalcone-treated, compared to the positive control. Corroborating the *in vivo* study, the compound markedly inhibited osteoclast differentiation and activity *in vitro*.

A study evaluating the effect of chalcone on bone resorption *in vivo* showed a result similar to that found in this study. Ovariectomized rats were daily treated for 5 weeks with intraperitoneal injection (10 mg / kg) of Xanthohumol³⁷ or vehicle. Histomorphometric analysis of the lumbar vertebra showed that bone volume and the number of bone trabeculae were significantly increased in rats treated with chalcone, while the distance between trabeculae was reduced. To confirm the observation that Xanthohumol inhibits bone resorption of osteoclast *in vivo*, the authors employed the RANKL-injection-induced bone resorption mouse model at calvaria of animals. Immunohistochemical staining of histological sections containing samples of calvaria demonstrated that fewer TRAP-positive cells were found in animals treated with Xanthohumol (10mg / kg), indicating that the compound can reduce bone loss and inhibit osteoclastic activity *in vivo*³⁷. In our study, Chalcone T4 significantly reduced bone resorption *in vivo* using half the reported dose (5mg / kg), and this effect was

associated with a reduction of TNF- α and NF- κ B (mediators with roles relevant to osteoclast differentiation and activity), in addition to downregulation of CD45 + cells by the lower dose of chalcone T4.

TNF- α is among the most important inflammatory mediators in osteoclast activation^{38,39} acting directly and indirectly in the process of osteoclastogenesis. It can increase the number of osteoclast precursor cells and the expression of RANKL in these cells, in addition to decreasing osteoblast differentiation⁴⁰ through the modulation of important mediators in osteoblastogenesis (such as RUNX2). In addition, TNF- α also acts with other cytokines and growth factors to promote osteoclast formation and bone resorption. In inflammatory scenarios, TNF- α can stimulate the autocrine and paracrine production of MMP-13, which in addition to the destructive proteolytic activity, degrading collagen present in mineralized and non-mineralized tissues, may act directly on the formation and activity of osteoclasts, favoring the development of osteolytic lesions⁴¹. When associated with IL-6, TNF- α synergistically can stimulate stromal cells to produce RANKL, as well as acting directly on osteoclasts and their precursors^{42,43}. In this study, systemic administration of 5mg / kg of chalcone T4 significantly inhibited the levels of TNF- α in the gingival tissues, suggesting a possible biological mechanism for the anti-resorptive effect of chalcone.

The modulation of NF- κ B by the compound also seems to be associated with the anti-inflammatory effects observed in our study. Investigations evaluating the potential of chalcones in the regulation of osteoclastogenesis have demonstrated that the modulation of this transcription factor has a critical role in this regulatory process⁴⁴. The activation of the NF- κ B pathway can induce the production of genes that stimulate the differentiation of osteoclasts, favor their survival and bone resorption, in addition to activating the transcription factors NFATc1 and c-Fos, which are essential for the differentiation of osteoclasts⁴⁴. In our study, the lowest dose of chalcone T4 markedly reduced the number of positive NF- κ B cells present in the gingival tissue, contributing to the reduction of the inflammatory process and bone loss induced by ligatures. Similar to our results, the modulation of NF- κ B by chalcones has shown to be a consistent finding in other studies *in vivo*⁴⁵⁻⁴⁷ and *in vitro*^{48,49}.

Interestingly, the reduction in bone resorption by chalcone T4 *in vivo* was not associated with a significant reduction in the expression of NFATC1 by the

compound. This transcription factor plays a pivotal role in osteoclast activation via up-regulation of various genes in processes such as, osteoclast adhesion, migration, acidification, and degradation of bone matrix⁵⁰. Although the chalcone T4 has slightly reduced the expression of NFATC1 (15% reduction in relation to the positive control group), it is likely that other mediators and mechanisms NFATC1- independent, are more critically involved in this anti-osteolytic effect.

The potential of chalcone T4 on the inhibition of bone resorption observed in our *in vivo* study was corroborated by data from the *in vitro* study, that show an inhibitory effect of the compound on the differentiation and activity of osteoclasts, even when low concentrations were used. Chalcone T4 reduced in approximately 80% the number of osteoclasts induced by RANKL after treatment of macrophages with 2.5 μ M, and completely inhibited its activity after treatment with 5 μ M. These results are superior to those found by Kim et al⁵¹, in which reduced activity and differentiation of osteoclasts were obtained after treatment of macrophages with 5 μ M and 20 μ M, respectively, of Panduratin A, a natural chalcone.

Additional studies demonstrating the effect of chalcone T4 on other critical mediators and signaling pathways in osteoclastogenesis, as well as on the RANKL signaling pathway upstream NFATC1, should be conducted to explore the anti-resorptive mechanisms of the compound. Our data demonstrated that unlike the NF- κ B pathway, P38 MAPK was not modulated by chalcone *in vivo*. It is possible that other members of the MAPK family, such as ERK or JNK, or other relevant signaling pathways in osteoclastogenesis, such as AKT, have an important role in the effects of chalcone T4 on inflammatory bone resorption.

CONCLUSION

In summary, this study provides evidence that Chalcone T4 administered orally inhibited alveolar bone resorption and inflammation associated with the experimental periodontitis *in vivo* and osteoclastogenesis *in vitro*, suggesting a therapeutic role for this compound in the treatment of this condition and in other osteolytic pathologies. The results presented by the compound are superior to the data presented by other chalcones, showing the robustness of its biological effects.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by FAPESP 2018/17047-3 awarded to Guimaraes-Stabili, MR (Sao Paulo, SP, Brazil). The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Chen B, Wu W, Sun W, et al. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from?. *Biomed Res Int*. 2014;731039.
2. S. Tanaka, T. Miyazaki, A. Fukuda, et al. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1068:180–186.
3. H. Takayanagi. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:292–304.
4. H. Hotokezaka, E. Sakai, N. Ohara, 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.
5. S. Takeshita, K. Kaji, A. Kudo. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into B mature osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 2000;15:1477–1488.
6. Teitelbaum SL. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):201.
7. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, et al. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol.* 2013:181849.
8. Walsh MC, Choi Y, et al. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511.
9. Cetinkaya MB, Kökçü A, Yanik FF, et al. Comparison of the effects of transdermal estrogen, oral estrogen, and oral estrogen-progestogen therapy on bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(1):44-8.
10. Verron E, Bouler JM, et al. Is bisphosphonate therapy compromised by the emergence of adverse bone disorders?. *Drug Discov Today.* 2014;19(3):312-9.
11. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288(3):321-33.

12. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1479-91.
13. Verron E, Bouler JM, et al. Is bisphosphonate therapy compromised by the emergence of adverse bone disorders?. *Drug Discov Today.* 2014;19(3):312-9.
14. Rodan GA, Martin TJ, et al. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000;289(5484):1508-14.
15. X Chen, X Cai, R Le, M Zhang, et al. Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;496:245-252.
16. S Nakamura, T Watanabe, T Tanigawa, et al. Isoliquiritigenin Ameliorates Indomethacin-Induced Small Intestinal Damage by Inhibiting NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome Activation. *Pharmacology.* 2018;101:236-245.
17. AA Ali, AL Abd, EN Haleem, et al. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Pharmacol Rep.* 2017;69:268-275.
18. EG Jung, KI Han, HJ Kwon, et al. Antiinflammatory activity of sappanchalcone isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a collagen-induced arthritis mouse model. *Arch Pharm Res.* 2015;38:973-83.
19. W Zheng, H Zhang, Y Jin, 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.
20. SW Maurya, K De, KB Singh, et al. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic analogues of pregnenolone as novel anti-osteoporotic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27:1390-1396.
21. E Almelah, DP Smith, A McGown, et al. Dibenzoyl-methane Derivatives as a Potential and Exciting New Therapy for the Treatment of Childhood Bone Cancer. *Anticancer Res.* 2016; 36:6043-6050.
22. G Silva, M Marins, AL Fachin, et al. Anti-cancer activity of transchalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. *Mol Carcinog.* 2016;55:1438-48.

23. H.K. Hsieh, T.H. Lee, J.P. Wang, et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. *Pharm Res.* 1998;15:39-46.
24. B Nijampatnam, L Casals, R Zheng, et al. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26:3508-13.
25. H.S. Ban, K. Suzuki, S.S. Lim, 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.
26. VR Yadav, S Prasad, B Sung, et al. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2011;11 :295-309.
27. D Batovska, T Todorov. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr Clin Pharmacol.* 2010;5:1-29.
28. Sung B, Prasad S, Yadav VR, et al. RANKL signaling and osteoclastogenesis is negatively regulated by cardamonin. *PLoS One.* 2013;8(5):e64118.
29. Ban HS, Suzuki K, Lim SS, 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(8):1549-57.
30. E Karimi-Sales, S Jeddi, A Ghaffari-Nasab, et al. Effect of trans-chalcone on hepatic IL-8 through the regulation of miR-451 in male rats. *Endocr Regul.* 2018; 52:1-5.
31. S Wankhede, N Kum, L Simon, et al. Evaluation of in vitro and in vivo anticancer potential of two 5-acetamido chalcones against breast cancer. *EXCLI J.* 2017;16:1150-1163.
32. Q Ma, YY Ruan, H Xu, et al. 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.
33. LM Mus, G Denecker, F Speleman, et al. Vehicle development, pharmacokinetics and toxicity of the anti-invasive agent 4-fluoro-3',4',5'- trimethoxychalcone in rodents. *PLoS One.* 2018;13: e0192548.
34. Nguyen DH, Zhou T, Shu J, et al. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes.* 2013;2(1):e.

35. Newman DJ, Cragg GM, et al. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012;75(3):311-35.
36. Carter GT. Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Nat Prod Rep*. 2011;28(11):1783-9.
37. J Li, L Zeng, J Xie, 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. Schett, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *European Journal of Clinical Investigation*. 2011; 41:1361-1366
39. Kinane, D.F. et al. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38(11)44-48.
40. B Zha. TNF and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15:126-134.
41. J Fu, S Li, R Feng, et al. Multiple myelomaderived MMP-13 mediates osteoclast fusogenesis and osteolytic disease. *J Clin Invest*. 2016;126:1759–1772.
42. S Herman, G Kronke, G Schett. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy, *Trends Mol Med*. 2008;14:245-53.
43. Y Ishimi, C Miyaura, CH Jin, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*. 1990;145:3297-303.
44. SA Krum, J Chang, G Miranda-Carboni, et al. Novel functions for NFκB: inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6:607-11.
45. Hu ZC , Xie ZJ , Tang Q, et al. Hydroxysafflor yellow A (HSYA) targets the NF-κB and MAPK pathways and ameliorates the development of osteoarthritis. *Food Funct*. 2018;9(8):4443-4456.
46. Hara H, Ikeda R, Ninomiya M, et al. Newly synthesized 'hidabeni' chalcone derivatives potently suppress LPS-induced NO production via inhibition of STAT1, but not NF-κB, JNK, and p38, pathways in microglia. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(6):1042-9.
47. Lu M, Wang S, Han X, et al. Butein inhibits NF-κB activation and reduces infiltration of inflammatory cells and apoptosis after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 2013;542:87-91.

48. Jin H, Kim HS, Seo GS, et al. A new chalcone derivative, 3-phenyl-1-(2,4,6-tris(methoxymethoxy)phenyl)prop-2-yn-1-one), inhibits phorbol ester-induced metastatic activity of colorectal cancer cells through upregulation of heme oxygenase-1. *Eur J Pharmacol.* 2018;841:1-9.
49. Venkateswararao E, Sharma VK, Yun J, et al. Anti-proliferative effect of chalcone derivatives through inactivation of NF- κ B in human cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(13):3386-92.
50. Zhao Q, Wang X, Liu Y, et al. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(5):576-9.
51. Kim H, Kim MB, Kim C, et al. Inhibitory Effects of Panduratin A on Periodontitis-Induced Inflammation and Osteoclastogenesis through Inhibition of MAPK Pathways In Vitro. *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28(2):190-198.

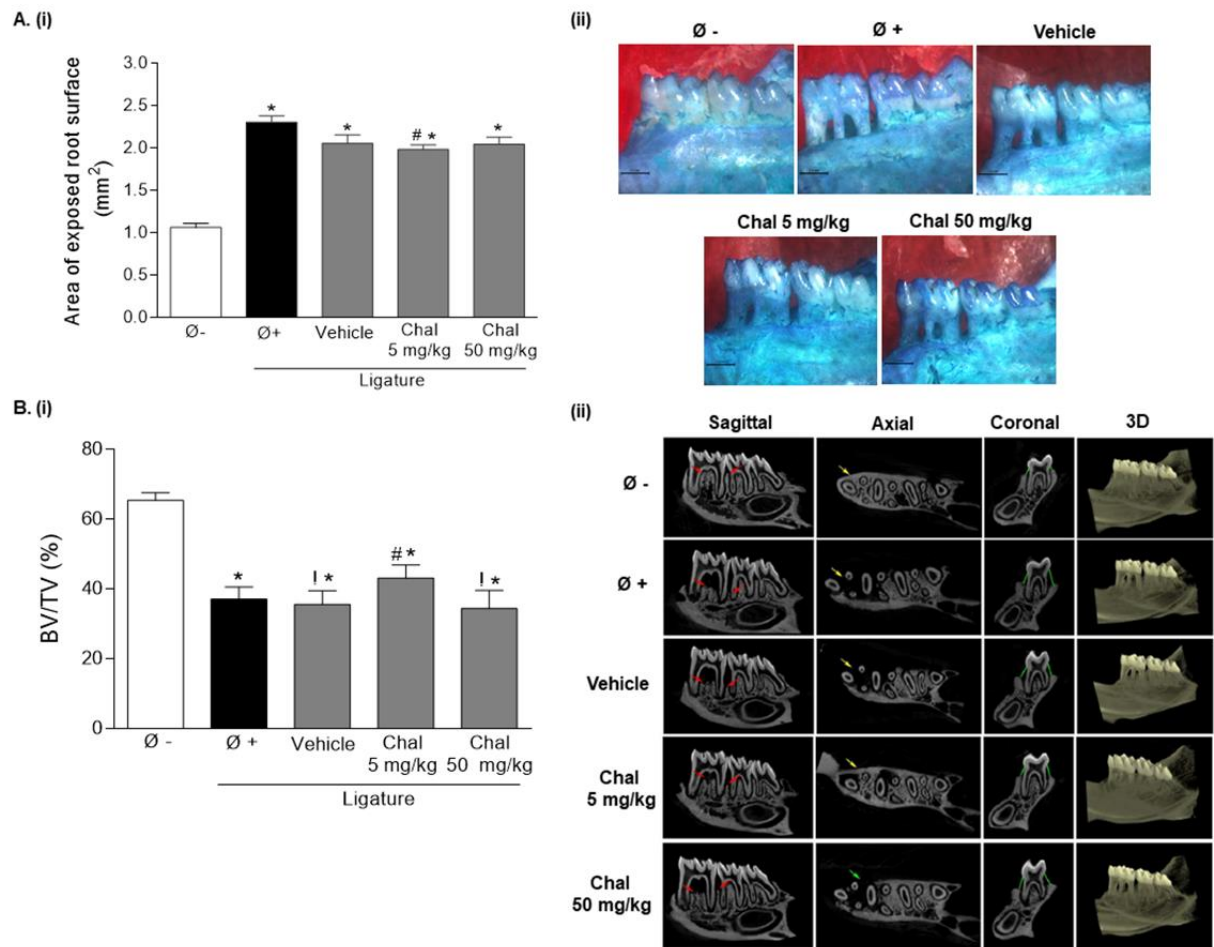


Figure 1: Chalcone T4 5 mg/kg reduced inflammatory bone resorption in the ligature-induced model of periodontal disease. **A.(i)** The bar graph represents the macroscopic quantitative analysis of exposed root surface area from 8 animals in each experimental condition; **(ii)** Representative images of each experimental group obtained at 1.25x magnification. **B.(i)** The bar graph represents the quantitative results of the ratio of mineralized tissue (BV/TV) in the defined and standardized region of interest (ROI), according to the experimental condition from 8 animals in each experimental condition; **(ii)** Representative images of each experimental group obtained in the sagittal, axial, coronal and 3D planes. The bars indicate average values and the vertical lines the standard error of the mean (SEM). (*) $p < 0.0001$ compared with the Ø- group. (#) $p < 0.0001$ compared with Ø+ group. (!) $p < 0.0001$ compared with chalcone 5 mg/kg group.

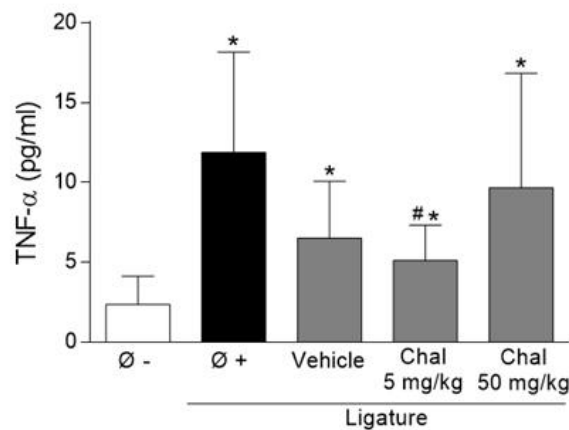


Figure 2: Chalcone T4 5 mg/kg effectively reduced the production of TNF- α in the gingival tissues in the ligature-induced model of experimental periodontal disease. Placement of the ligature increased the levels of TNF- α and the chalcone significantly reduced this overexpression, with no dose-response effect. The assay was performed according to manufacturer's instructions and the results normalized to the total protein concentration (40 μ g) in each sample. The bars indicate the average normalized concentration and vertical lines the standard error of the mean (SEM) from 6 different animals in each experimental condition). (*) $p < 0.05$ compared with the Ø- group. (#) $p < 0.05$ compared with Ø+ group.

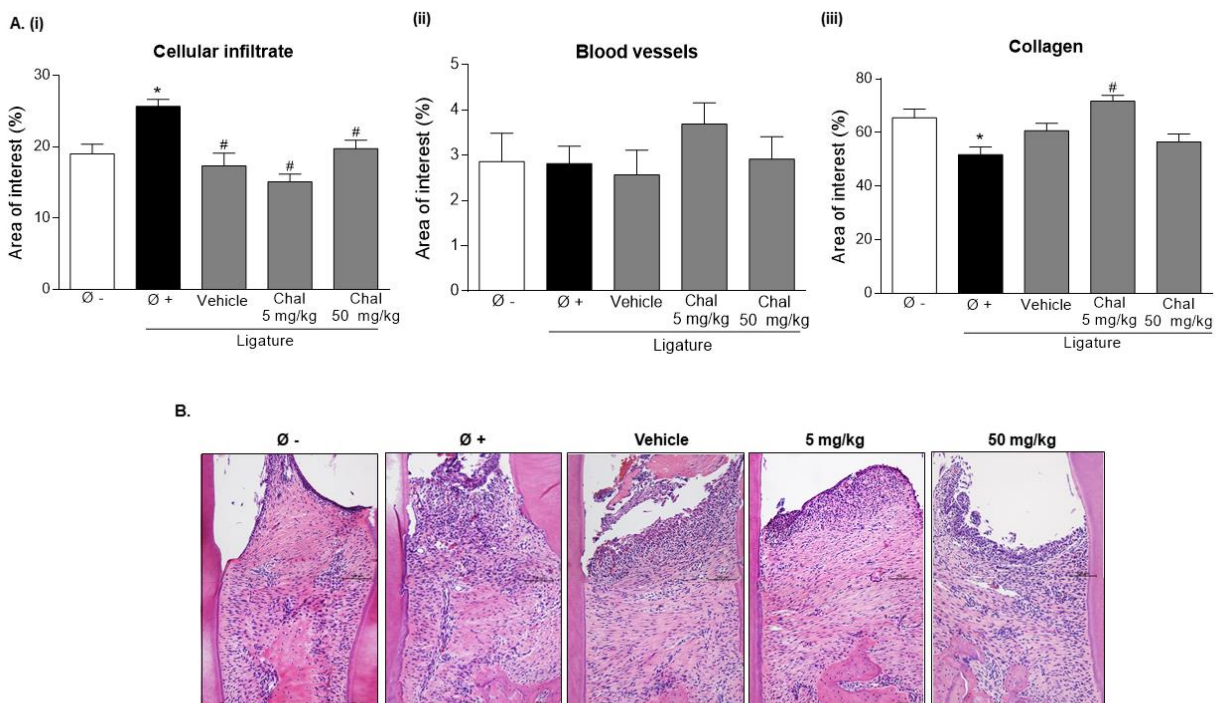


Figure 3: Stereometric analysis of the gingival tissues according to treatments. A grid was overlaid on the region of interest and a percentage analysis of the tissue components was performed in relation to the total number of points counted. **A.** Stereometric analysis of tissues components: chalcone T4 decreased cellular

infiltrate in both doses, and increased collagen content at 5 mg/kg dose. **B.** Histological aspect of the experimental groups (200x magnification). The bars indicate the percentage average value and vertical lines the standard error of the mean (SEM). (*) $p < 0.0002$ compared with the $\emptyset$ - group. (#) $p < 0.0002$ compared with $\emptyset$ + group.

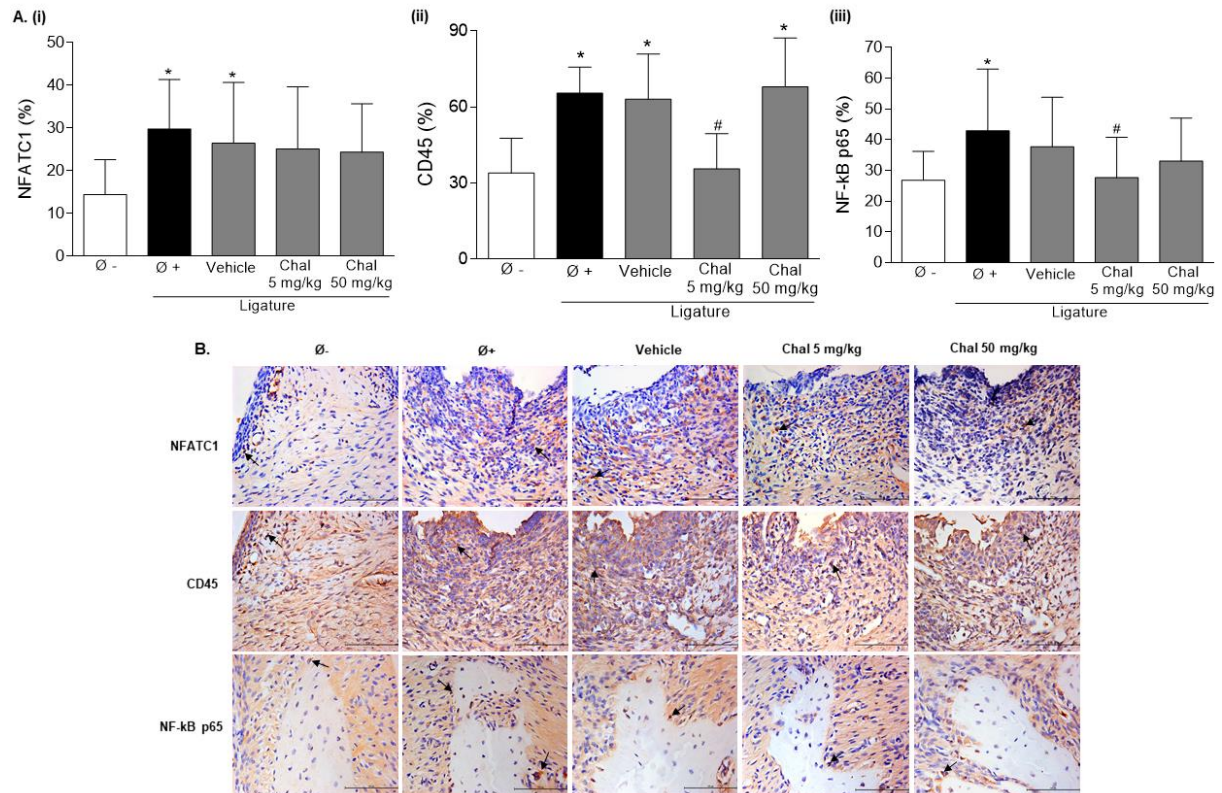


Figure 4: Chalcone T4 5 mg/kg reduced the expression of NF-kB and CD45 in the region of interest analyzed, and slightly reduced the expression of NFATC1. **A.** Percentage of cells positively stained with antibodies to NF-kB, NFATC1 and CD45. **B.** Images of the immunohistochemistry staining (arrows) of the experimental groups (400x magnification). The bars indicate the percentage average value and vertical lines the standard error of the mean (SEM). (*) $p < 0.005$ compared with the $\emptyset$ - group. (#) $p < 0.005$ compared with $\emptyset$ + group.

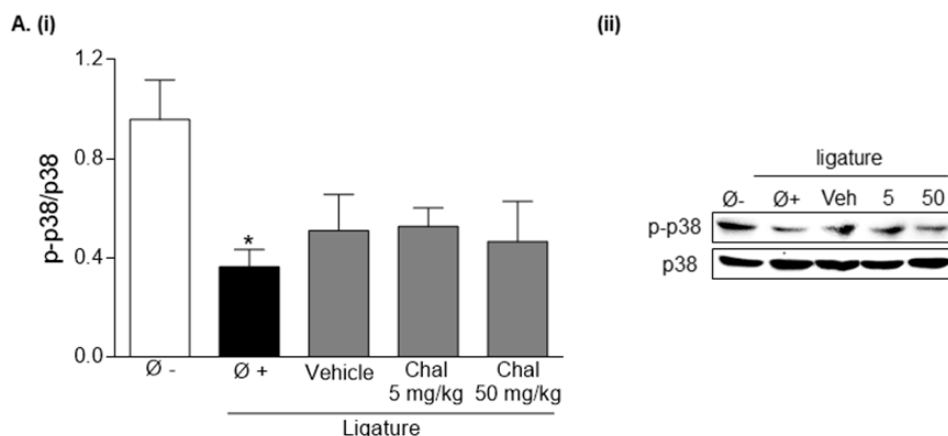


Figure 5: Chalcone T4 had no effect on the activation of the p38 intracellular signaling pathway. Interestingly, animals in the control group presented higher p38 activation. The results were normalized to the total protein concentration (40 μ g) in each sample extracted from gingival tissue around the first molar to detect total and activated (phosphorylated) forms of p38 MAPK. **A. (i)** The bars indicate the mean and the vertical lines the standard error (SEM) of the densitometric quantification of 6 animals per group. **(ii)** Densitometric image of western blot bands. (*) $p < 0.02$ compared with the $\emptyset$ - group.

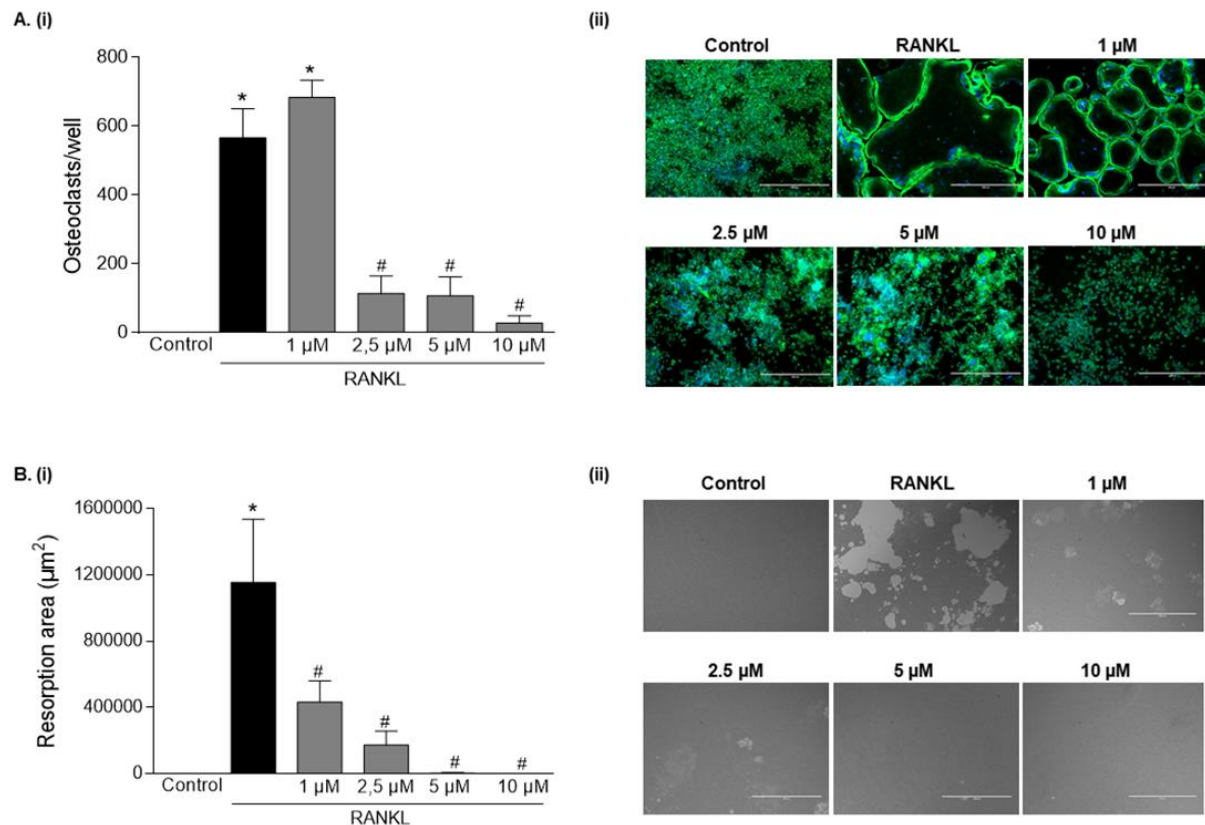
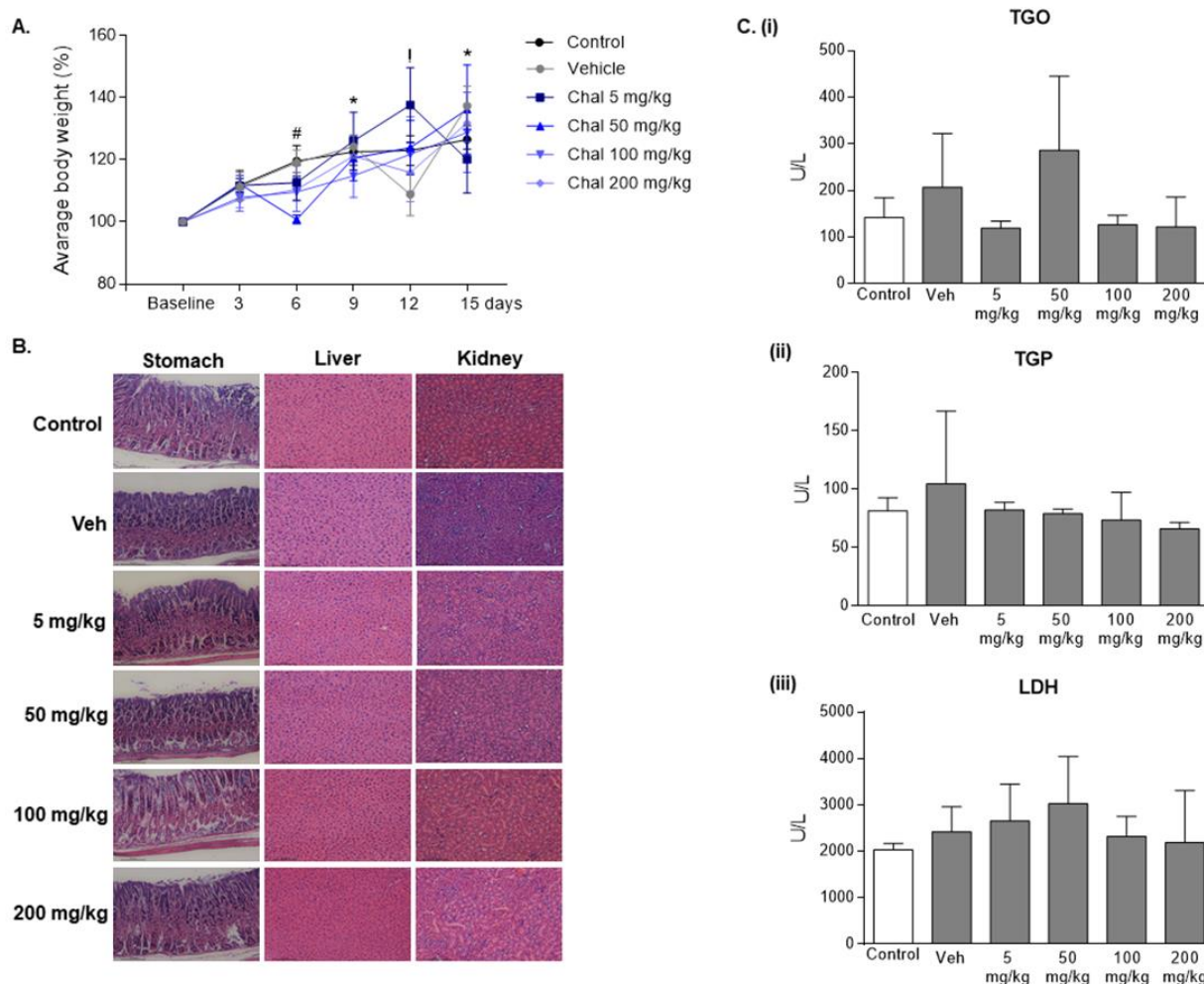
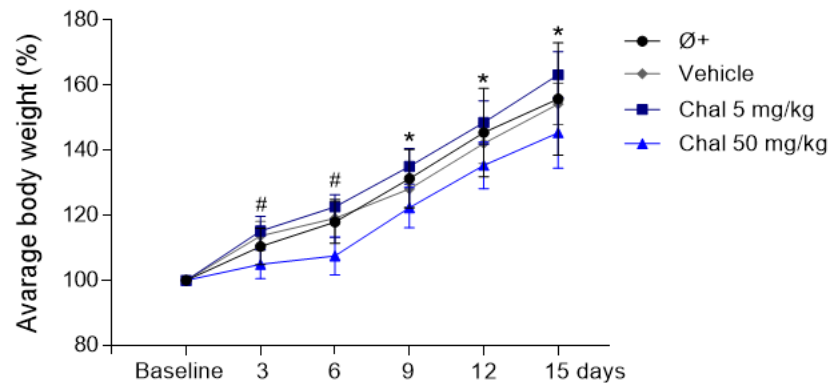


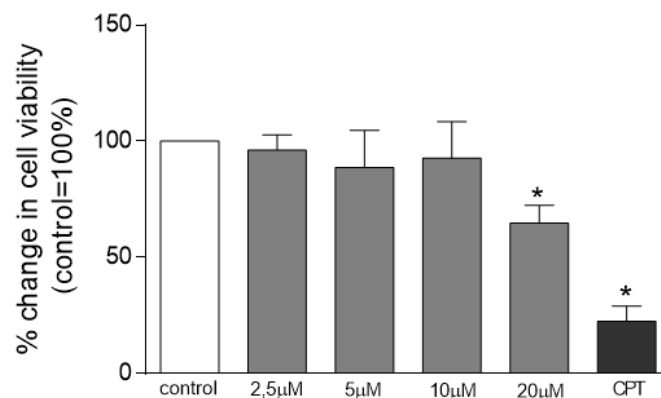
Figure 6: Chalcone T4 inhibits RANKL-induced osteoclast formation and activity in vitro. RAW 264.7 cells were treated with chalcone T4 and after 30 min stimulated with RANKL. Medium was changed and these stimuli re-applied every 48 hours during the 7 days of experiment. **A. (i)** Quantitative result of the number of osteoclasts per well. Inhibition of osteoclast formation is observed in the concentrations 2.5, 5 and 10 μ M of chalcone T4; **(ii)** Representative images of the inhibition of osteoclast formation by chalcone T4 evaluated by fluorescence microscopy (100x magnification). **B. (i)** Quantitative result of the osteoclast activity per well. Inhibition of osteoclast activity is observed in all concentrations of chalcone T4; **(ii)** Representative images of the inhibition of osteoclast activity by chalcone T4 (100x magnification). The bars indicate the average values and vertical lines the standard error of the mean (SEM) from three different experiments assessed in triplicate. (*) $p < 0.0001$ compared with the control group. (#) $p < 0.0001$ compared with RANKL group.



(supplementary) Figure 1: Administration of T4 chalcone at different doses did not cause toxicity. **A.** The bar graph represents the quantitative results of the average percentage of body weight (%) over the experimental period of 3 animals per group. **B.** Representative histological image of the stomach, liver and kidney of the animals according to the experimental groups (200x magnification). **C.** The bar graph represents the quantitative results of the systemic levels of TGO, TGP and LDH of the animals according to the experimental groups. The bars indicate the average concentration and vertical lines the standard error of the mean (SEM) from 3 animals per group. (*) $p < 0.0002$ of all groups compared with baseline. (#) $p < 0.0002$ of all groups compared with baseline, except chalcone 50 mg/kg. (!) $p < 0.0002$ of all groups compared with baseline, except chalcone vehicle.



(supplementary) Figure 2: Administration of T4 chalcone in the ligature-induced model of experimental periodontal disease did not cause weight loss in rats. The bar graph represents the quantitative results of the average percentage of body weight (%) over the experimental period from 8 animals per group. (*) $p < 0.0001$ of all groups compared with baseline. (#) $p < 0.0001$ of all groups compared with baseline, except chalcone 50 mg/kg.



(supplementary) Figure 3: Chalcona T4 in concentrations of 2.5, 5 and 10 µM did not show cytotoxicity. The graph shows the change in the viability of the RAW 264.7 cells compared to the control after treatment with different concentrations of chalcone T4. Cells treated with camptothecin (CPT) (apoptosis-inducing compound) were used as a positive control. Only the dose of 20 µM of chalcone T4 reduced significantly the cell viability. (*) $p < 0.0001$ compared with control group. The bars indicate the percentage of cell viability (%) and vertical lines the standard error of the mean (SEM) from three different experiments assessed in triplicate.

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.

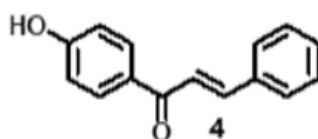
61. Sung B, Prasad S, Yadav VR, Gupta SC, Reuter S, Yamamoto N et al. RANKL signaling and osteoclastogenesis is negatively regulated by cardamonin, PLoS One. 2013; 8(5): e64118.
62. Karimi-Sales E, Jeddi S, Ghaffari-Nasab A, Salimi M, Alipour MR. Effect of trans-chalcone on hepatic IL-8 through the regulation 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.

APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS

1 CHALCONA T4

A substância encontra-se depositada na compostoteca do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto. A seleção pela chalcona substituída por grupos hidroxila e metoxila deve-se à presença destes substituintes nos flavonoides naturais. A chalcona foi sintetizada sob orientação do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, colaborador deste projeto. A síntese da substância foi realizada por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, com rendimentos satisfatórios (50–70%). Para a purificação das substâncias utilizou-se técnicas de recristalização e cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna de fase normal (gel de sílica), cromatografia em coluna de fase reversa (octadecilsilano) e cromatografia de permeação em gel (LH-20). A estrutura do composto foi identificada por espectrometria de massas e técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C). A estrutura da chalcona foi esboçada na figura 2. A pureza da substância foi determinada por análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), exibindo valores iguais ou superiores a 95.0%.

Figura 2 – Estrutura da Chalcona T4



Fonte: Elaboração própria

2 OBJETIVO ESPECÍFICO (i): AVALIAR IN VIVO O POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTI-REABSORTIVO DA CHALCONA T4

2.1 Estudo Preliminar (Ensaio de Toxicidade Aguda Oral)

A literatura tem demonstrado ausência de toxicidade dos compostos chalcônicos em estudos pré-clínicos⁶²⁻⁶⁵, em doses de até 300 mg/kg⁶⁵ via oral. Entretanto, considerando que este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da

administração sistêmica da chalcona T4, experimento de toxicidade in vivo foi realizado previamente aos estudos subsequentes.

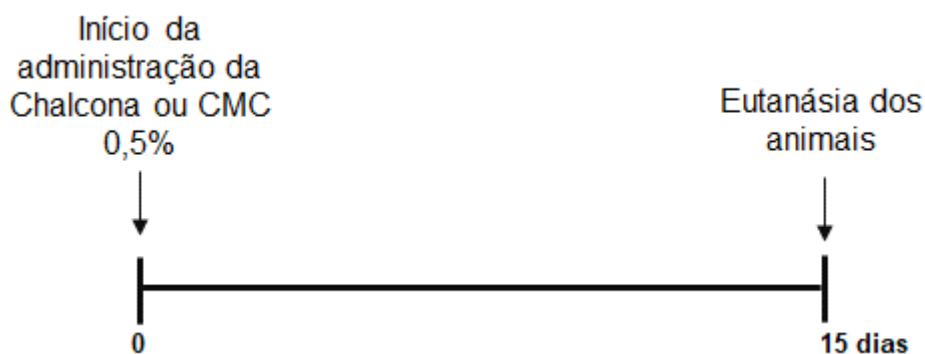
2.1.1 Animais

Foram utilizados 18 camundongos Swiss (*Mus musculus domesticus*, Swiss) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pesando 25-30 g no início dos experimentos. Os animais foram alojados no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), sob temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade (65-75%) e ciclos de luz controlado (12h claro-12h escuro) de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com padrões éticos que cumprem integralmente ARRIVE guidelines. Ração granulada padrão e água ficaram disponíveis *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo 18/2018), e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) .

2.1.2 Compostos

A chalcona foi diluída em carboximetilcelulose (CMC) 0,5% e administrada nas doses de (5, 50, 100, 200 mg/kg) de peso corporal, de acordo com o grupo experimental, diariamente, por gavagem intragástrica durante 15 dias (mesmo período de administração das chalconas nos estudos subsequentes).

Figura 3 - Protocolo experimental



Linha do tempo demonstrando o período experimental, a administração da chalcona, e o período de eutanásia.

Fonte: Elaboração própria

2.1.3 Grupos Experimentais

Quadro 1 - Grupos experimentais de acordo com o composto administrado

Grupo (n=3)	Composto administrado
Controle	-
Veículo	Veículo (CMC 0,5%)
Chalcona I	Chalcona 5 mg/kg
Chalcona II	Chalcona 50 mg/kg
Chalcona III	Chalcona 100 mg/kg
Chalcona IV	Chalcona 200 mg/kg

Fonte: Elaboração própria

2.1.4 Avaliação Comportamental e Peso Corporal

Durante todo o período experimental os animais foram avaliados quanto ao peso corporal e alterações comportamentais (atividade geral, motilidade, atos de lambar as patas, coçar focinho, morder a cauda, tremores finos/grosseiros, tremor da cauda e lacrimação). Na orelha foi observado a palidez, cianose e hiperemia. Outros efeitos observados foram diarreia, contorção, reação de fuga, agressividade, hipotermia e morte. Estas alterações foram diariamente avaliadas nos seguintes períodos após administração da chalcona: 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas, durante os 15 dias do período experimental.

2.1.5 Eutanásia e Obtenção de Amostras para Análise Histopatológica

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e os órgãos (fígado, rim e estômago) coletados para análise histopatológica. Após serem fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas, as amostras foram processadas e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram então seccionados em micrótomo convencional, em uma espessura de 3 µm, e os cortes obtidos foram submetidos ao processo de coloração por Hematoxilina e Eosina (H/E). Após coloração, as imagens histológicas foram capturadas com o auxílio de um microscópio de luz (Leica DM2500) na magnificação de 200x e as fotomicrografias utilizadas para análise da presença de alterações teciduais que indicassem sinais de toxicidade (presença de

processo inflamatório, alteração volumétrica da vasculatura, necrose e/ou ulceração).

2.1.6 Punção Intracardíaca para Análise Bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas no momento da eutanásia por punção intracardíaca. Os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal, e uma agulha com calibre de 26G foi inserida na base do esterno com aproximadamente 20 graus de inclinação, na lateral da linha média do lado esquerdo. O sangue foi aspirado lentamente com o auxílio de uma seringa de 1 ml. As amostras foram acondicionadas e analisadas no mesmo dia para dosagem de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e lactato desidrogenase (LDH) para análise da presença de dano hepático.

2.2 Indução da Doença Periodontal e Administração da Chalcona

Para avaliar o efeito da chalcona T4 durante a progressão da doença periodontal foram utilizados 48 ratos *Holtzman* (*Rattus norvegicus albinus*, *Holtzman*). Os animais foram alojados no Biotério do Subsolo do Bloco de Biomorfológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, 4 animais por caixa, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com fase clara se iniciando às 7 horas da manhã, e umidade (50 + 20%) e temperatura (23 + 2°C) controladas, de acordo com o CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e o Comitê de Ética em experimentação Animal (CEUA) desta instituição. Ração granulada padrão e água ficaram disponíveis *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo 18/2018). Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais (08 animais por grupo) (Quadro 2). O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos dados histomorfométricos de estudos com desenho experimental semelhante^{67,68}. Foi verificada a diferença mínima entre as médias dos dados histomorfométricos de 16.42% com desvio padrão aproximado de 8.00. Portanto, ao se aplicar o teste ANOVA levando-se em consideração um poder β do estudo de 0.8 e o poder α de 0.05, determinou-se uma amostra mínima de 7

animais por grupo. Considerando a possibilidade de perda de algum animal durante o protocolo experimental, utilizamos 8 animais por grupo.

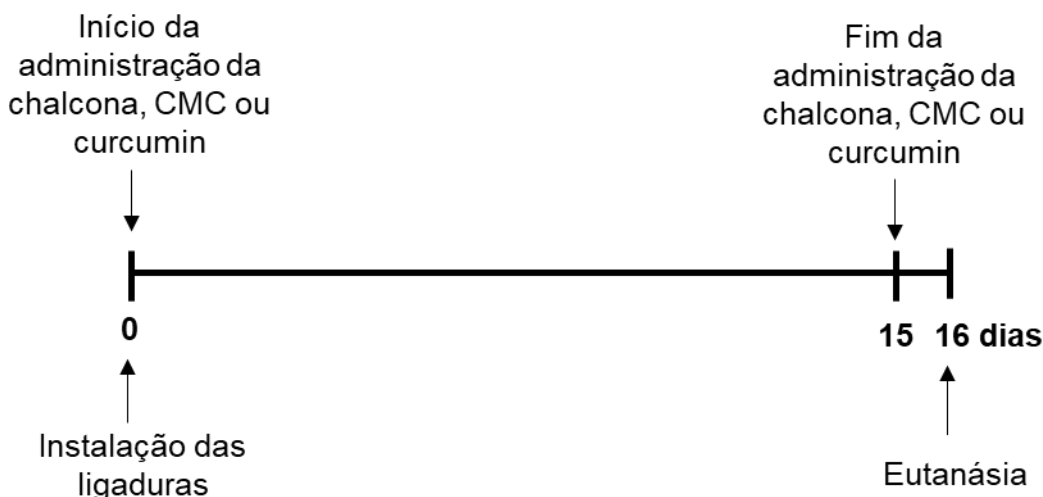
A chalcona foi administrada aos animais por gavagem intragástrica, diariamente, durante os 15 dias do experimento. Foram selecionadas as menores doses não tóxicas da chalcona (5 mg/kg e 50 mg/kg - avaliadas no estudo de toxicidade). No mesmo dia do início da administração da chalcona os animais foram submetidos à indução da doença periodontal (Figura 3). Para indução da doença os animais foram anestesiados (Quetamina (80 mg/ kg) e Xilazina (7 mg/ kg)) e posicionados em mesa operatória para instalação das ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente. Após 15 dias da colocação das ligaduras os animais foram eutanasiados. O período de 15 dias foi selecionado por ser representativo da doença instalada em nível moderado/avançado de severidade, como indicado por estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa^{69,70}. Para efeito comparativo, foi realizado um grupo experimental com curcumin na dose de 30 mg/kg. Estudos recentes do nosso grupo⁷⁵⁻⁷⁸ têm demonstrado que curcumin, um composto natural com potentes atividades anti-inflamatórias, reduz o processo inflamatório em modelo experimental de doença periodontal.

2.2.1 Compostos

Chalcona foi diluída em CMC 0,5% e administrada nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg (doses não tóxicas) de acordo com o grupo experimental. Curcumin (Sigma-Aldrich #c1386) foi administrado aos animais em dose de 30 mg/kg e diluído em CMC 2,5%. Os compostos foram administrados de acordo com o grupo experimental, diariamente, por gavagem intragástrica por 15 dias.

2.2.2 Protocolo Experimental

Figura 4 – Protocolo experimental



Linha do tempo demonstrando o período experimental, o momento da instalação das ligaduras, a administração dos compostos e o período de eutanásia.

Fonte: Elaboração própria

2.2.3 Grupos Experimentais

Quadro 2: Grupos experimentais de acordo com o composto administrado

Grupo (n=8)	Indução da doença periodontal	Procedimento (gavagem intragástrica)
Controle negativo (Ø-)	Não	Administração de água destilada
Controle positivo (Ø+)	Sim	Administração de água destilada
Veículo – CMC 0,5%	Sim	Administração de CMC 0,5%
Chalcona I	Sim	Administração de chalcona 5 mg/kg
Chalcona II	Sim	Administração de chalcona 50 mg/kg
Curcumin	Sim	Administração de curcumin 30 mg/kg

Fonte: Elaboração própria

2.2.4 Obtenção das Amostras no Momento da Eutanásia

No momento da eutanásia, o maxilar inferior foi dividido em duas hemimandíbulas. Na hemimandíbula direita, os tecidos periodontais não mineralizados ao redor dos primeiros molares inferiores foram dissecados cuidadosamente de cada animal e processados para as análises moleculares (avaliação da expressão proteica por ensaio ELISA, ou das vias de sinalização intracelular por Western Blot, segundo descrito na seção correspondente). Após remoção do tecido gengival as hemimandíbulas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 48h, transferidas para etanol 70% e armazenadas para avaliação da perda óssea pela coloração com azul de metileno e microtomografia computadorizada (μ CT). A hemimandíbula esquerda, contendo o tecido mole ao redor dos molares, foi armazenada em paraformaldeído 4% por 48h e as peças foram descalcificadas em solução de EDTA 10%, pH 7.2 por 6 a 8 semanas para o preparo e inclusão em parafina, e utilizadas para as análises histológica e imuno-histoquímica. As amostras de biofilme foram coletadas juntamente com as ligaduras dos animais e imediatamente colocadas em tubos estéreis de microcentrífuga, contendo TRIS-HCL e EDTA, pH 7,6 (solução TE) para análise microbiológica.

2.2.5 Avaliação da Perda/Reparo Ósseo por Azul de Metileno

Para esta análise, as peças foram mantidas em solução de peróxido de hidrogênio por 3 horas e limpas com uma cureta e fricção vigorosa com compressas de gaze para remoção do tecido mole remanescente. A solução de azul de metileno foi preparada com a adição de 0,7g do corante dissolvidos em 50 ml de etanol a 95% com posterior diluição de 5 ml dessa solução em 15 ml de água destilada e manutenção das peças no corante por 2 minutos. Imagens da face vestibular das peças foram capturadas em estereomicroscópio (Leica HZ6 – magnificação de 1.25x) e toda a raiz do primeiro molar inferior foi considerada para mensuração da região compreendida entre a junção cimento esmalte e o osso alveolar. O esmalte dental não é corado pelo azul de metileno, portanto a área corada corresponde diretamente à extensão da reabsorção óssea. Toda a área da superfície radicular exposta foi medida utilizando o programa ImageJ (NIH Image), por um único avaliador cego para os grupos experimentais. Os resultados são representativos de 8 animais por grupo.

2.2.6 Avaliação da Perda/Reparo Ósseo por Microtomografia Computadorizada (μ CT)

As mandíbulas foram cuidadosamente dissecadas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 h, e armazenadas em etanol a 70% até serem digitalizadas em um sistema de imagem por μ CT (Skyscan 1076; Bruker, Kontich, Bélgica). As mandíbulas foram escaneadas usando resolução espacial isotrópica de 9 μ m (0,01 mm), filtro de alumínio de 0,5 mm, tensão de 80 kV, corrente de 310 μ A, exposição de 195 ms, média de quadro de 03 e passo de rotação de 0,4° em 180°. Para reconstrução (NRecon 1.6.1.5; Bruker), foram utilizados os seguintes parâmetros: correção de artefato em anel, 4; máscara de defeito de pixel, 5%; alisamento, 1%; correção de endurecimento do feixe, 26% e sensor comprimido (CS) para conversão de imagem, 0,0-0,8. A região de interesse padronizada (ROI) foi definida em uma orientação sagital na área de furca do primeiro molar inferior que se estende do topo da furca até os ápices radiculares. Esse ROI foi delimitado a cada dez planos, com 90 fatias. A fração do volume do ROI ocupado pelo tecido mineralizado (volume da fração óssea (BVF)) foi quantificado. Um examinador cego e experiente realizou todas as medidas de μ CT.

2.2.7 Determinação dos Níveis Proteicos de TNF- α (ELISA)

Amostras de proteína total foram extraídas dos tecidos periodontais removidos no momento da eutanásia. Para isto, foi utilizado o tampão de extração T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent – Pierce Biotechnology) suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Protein Stabilizing Cocktail – Santa Cruz Biotechnology). Este tampão foi adicionado aos tecidos, os quais foram macerados, centrifugados por 5 minutos a 13.000 RPM a 4° C, com posterior remoção do sobrenadante. As amostras de proteína foram então utilizadas para realização do ELISA para quantificação dos níveis de TNF- α , de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems), e a concentração das proteínas-alvo foi normalizada para o conteúdo de proteína total determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad). Os resultados são representativos de 6 animais por grupo.

2.2.8 Análise Estereométrica

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Leica DM2500) na magnificação de 200x. Um total de 3 cortes semi-seriados, de 4 µm de espessura, com um intervalo de aproximadamente 320 µm, foram avaliados por bloco, provenientes de quatro animais por grupo experimental. Os cortes receberam a coloração de H/E para avaliação da proporção de componentes teciduais em um plano bidimensional por microscopia. Com esta finalidade foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: infiltrado celular (fibroblastos e células inflamatórias), fibras colágenas, e vasos sanguíneos na região anatômica de interesse. A região de interesse foi assim delimitada: tecido conjuntivo situado entre primeiro e segundo molar, delimitado coronalmente pela porção mais apical do tecido epitelial; apicalmente pelo topo da crista óssea; e lateralmente pela região mais proeminente da raiz distal do primeiro molar. Uma grade constituída por 154 pontos, simetricamente distribuídos, foi posicionada sobre a região de interesse e avaliada por um examinador que desconhecia os grupos experimentais. Em seguida foi feita uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por grupo experimental, para a representação gráfica da estereometria.

2.2.9 Imunodeteção e Quantificação da Inflamação e dos Fatores de Transcrição por Imuno-histoquímica

Para análise da expressão dos dos fatores de transcrição (NFATc1 e NF-κB p65) e quantificação de leucócitos (CD45), os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas e submetidos a reação de imuno-histoquímica utilizando anticorpos primários específicos e kit de visualização Dako Envision™ FLEX, High pH (Link) – (#K800021-2). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, rehidratados e posteriormente incubados por 15 minutos com solução de peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes histológicos que receberam o anticorpo para NFATc1 (Santa Cruz Biotechnology, #7294) e CD45 (Abclonal, #A2115) foram submetidos à etapa de recuperação antigênica com a solução do kit (Target retrieval solution high ph) em panela de pressão durante 3 minutos e deixados sobre a bancada para resfriamento por mais 10 minutos; os cortes que receberam o anticorpo para NF-κB (Santa Cruz Biotechnology, #8008)

foram submetidos à recuperação antigênica com tripsina 0,05% durante 10 min à 37°C, e permaneceram por mais 10 minutos para resfriamento na bancada. Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários e deixados por 18 h ('overnight') à 4° C em um compartimento umidificado. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Dako EnVision™ FLEX /HRP detection reagente), fornecido pelo kit. Todos os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carrazi e montados com Permount. Fotomicrografias em aumento de 20x foram obtidas usando um microscópio (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera digital. A região de interesse analisada foi assim delimitada: coronalmente pela porção mais apical do tecido epitelial; apicalmente pela região mediana da crista óssea; e lateralmente pela região mais proeminente da raiz distal do primeiro molar. Os resultados foram analisados de forma quantitativa por um examinador sem conhecimento dos grupos experimentais, através do software Image J e plugin IHC Profile, conforme descrito por Nguyen DH, et al.⁶⁶. Esta análise é baseada na determinação da intensidade da marcação e quantidade de células marcadas. 3 cortes por animal em um total de pelo menos 4 animais por grupo foram avaliados por um examinador cego para os grupos experimentais. Os resultados foram usados para determinar um valor médio por animal e em seguida estes valores foram comparados entre os grupos.

2.2.10 Western Blot

Com objetivo de investigar os efeitos da chalcona sobre a fosforilação da via de sinalização intracelular p38 MAPK, amostras de proteína total extraídas dos tecidos periodontais foram utilizadas para realização do Western Blot. Quantidades iguais de proteína total (40 µg) foram utilizadas por amostra. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida Tris-Cl a 10% (resolving gel) e 4% (stacking gel) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em tampão 5% BSA em TBS contendo 1% Tween-20 (TBS-T) e depois incubadas com o anticorpo primário (p-p38 #9211 Cell Signaling e p38 #9212 Cell Signaling) overnight. Após incubação com anticorpo secundário, a detecção da presença da proteína foi realizada por reação de quimioluminescência (SuperSignal West Pico, Pierce/ThermoFisher Scientific) e visualizada em um sistema de documentação digital (Chemi-Doc XR, Bio-Rad Laboratories). Os resultados foram

obtidos pela análise densitométrica das bandas e normalizados através da razão entre a forma fosforilada e não fosforilada da proteína alvo. O experimento foi realizado três vezes em duplicata.

2.2.11 Análise Microbiológica

Biofilme presente nas ligaduras removidas dos animais no momento da eutanásia foi utilizado para detecção das bactérias *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos. O DNA das bactérias foi extraído usando QIAamp DNA Mini Kit seguindo as instruções do fabricante. A quantificação e pureza das amostras de DNA foram realizadas em espectrofotômetro de nanovolumes (Nanoview Plus, GE Healthcare), e 100 ng de DNA total foi utilizado para a reação. Para quantificação de DNA de cada espécie bacteriana foi utilizado o sistema Taqman 5' e primers e sondas específicos (Quadro 3). As reações de Taqman eram compostas de 12,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technologies- Califórnia - USA), 4,5 µL de água estéril, 1 µL de cada primer e sonda, e 5 µL DNA de cada amostra. Os primers e sondas foram utilizados em diferentes concentrações, dependendo da bactéria utilizada. As condições de amplificação foram: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 s a 60 °C. A quantificação foi baseada em uma curva padrão de plasmídeo.

Quadro 3: Primers e sondas utilizados para detecção e quantificação de qPCR

Cepa bacteriana		Primer/Sondas (5'-3')	Comprimento do fragmento
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	Forward	GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA	80 bp
	Reverse	TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC	
	Probe	AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG	
<i>F. nucleatum</i>	Forward	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	162 bp
	Reverse	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA	
	Probe	CTC TAC ACT TGT AGT TCC G	
<i>P. gingivalis</i>	Forward	GCG CTC AAC GTT CAG CC	68 bp
	Reverse	CAC GAA TTC CGC CTG C	
	Probe	CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA	
	Reverse	ACC GTA ACG TGG GAA AAC TG	
	Probe	GTA GCG TCA GAG TGG TTG AC	
<i>S. oralis</i>	Forward	ACC AGC AGA TAC GAA AGA AGC AT	229 bp
	Reverse	AGG TTC GGG CAA GCG ATC TTT CT	
	Probe	AAG GCT GCT GTT GCT GAA GAA GT	

Fonte: Imagem cedida por Patrícia Milagros Maquera Huacho.

3 OBJETIVO ESPECÍFICO (ii): INVESTIGAR OS MECANISMOS BIOLÓGICOS DA CHALCONA SOBRE A OSTEOCLASTOGÊNESE IN VITRO

3.1 Viabilidade Celular

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e cultivadas em meio α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S). Após 6 horas, diferentes concentrações da Chalcona T4 (2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, e 20 μ M) e camptotecina 6 μ M (controle negativo) foram adicionadas aos poços e as células incubadas por 24 horas. Controle foi representado por células contendo meio sem adição do composto. Após 24 horas foi removido o meio presente nos poços e adicionado 90 μ l de meio puro + 10 μ l da solução estoque (5 mg/ml) contendo o sal tetrazólico (MTT) e incubado por 2 horas. Após este período, o MTT foi removido e acrescentado 50 μ l de isopropanol acidificado. Os resultados foram obtidos através da medição da absorbância a 490 nm em um leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices). O número de células viáveis nos poços tratados com a chalcona foi estimado em relação ao controle não tratado. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

3.2 Efeito da Chalcona T4 Sobre a Diferenciação de Osteoclastos – Coloração do Anel de Actina (Microscopia de Fluorescência)

Foram utilizadas as células precursoras de osteoclastos RAW 264.7. As células foram plaqueadas (2×10^3 céls/poço), em placa de 96 poços, e cultivadas em α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S) na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Diferentes concentrações da chalcona, ou veículo (DMSO 1%), foram acrescentados ao meio de cultura, em um volume total de 1 μ l/poço, (dia 0 do período experimental de 6 dias) em concentrações não citotóxicas (1, 2.5, 5 e 10 μ M), 30 min previamente ao estímulo com RANKL. O meio de cultura contendo o composto e o RANKL foram substituídos em intervalos de 48h, retirando-se 100 μ L com o auxílio de uma micropipeta e adicionando o mesmo volume de meio fresco com os tratamentos propostos. As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido até o término do experimento. Ao final do período experimental, as células foram fixadas e permeabilizadas (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences). Em seguida, as células

foram coradas com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (40 min à temperatura ambiente) e subsequentemente com DAPI (0.5 ug/mL, 5 min à temp. ambiente) e visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 10x. O número de osteoclastos foi quantificado em toda a extensão do poço, sendo considerado osteoclastos células com 3 ou mais núcleos. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

3.3 Efeito da Chalcona T4 na Atividade de Osteoclastos: Ensaio de Atividade

Para investigarmos o impacto da chalcona T4 sobre a atividade dos osteoclastos, RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços revestidas com fosfato de cálcio sintético (Osteologic Corning Plate, Corning), conforme descrito no protocolo anterior, por um período de 6 dias, seguindo as instruções do fabricante. Após o término do período experimental, o sobrenadante foi descartado e adicionado 50 µl de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min. Em seguida, os poços foram lavados com água Milli-Q. As placas foram deixadas sobre a bancada em temperatura ambiente por 24 horas para completa evaporação da água, e então fotografadas em microscópio invertido com câmera acoplada (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 10x. As áreas de reabsorção óssea foram quantificada em toda a extensão do poço através do software Image J. Este experimento foi realizado três vezes em triplicata de forma independente.

3.4 Avaliação dos Efeitos da Chalcona T4 Sobre a Expressão Gênica de Marcadores Ósseos (RT-qPCR)

Células RAW 264.7 foram plaqueadas (3×10^5 cels/poço), em placa de 6 poços, e cultivados em α -MEM completo na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Diferentes concentrações da chalcona diluída em DMSO 1% (total de 1,5 µl/poço), foram acrescentados ao meio de cultura em concentrações não citotóxicas (1, 2.5, 5 e 10 µM), 30 min previamente ao estímulo com RANKL. O meio de cultura condicionado com o composto e o RANKL foi substituído em intervalos de 48h. Ao final do 3º e 5º dia foi realizada a extração do RNA total das células com o kit Total RNA Purification (Cellco Biotec) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e pureza das amostras de RNA foram realizadas em espectrofotômetro de nanovolumes (Nanoview Plus, GE Healthcare), e o cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (High capacity

cDNA synthesis kit, Applied Biosystem). A detecção da expressão gênica na amostra foi realizada utilizando o sistema TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technologies- Califórnia - USA). Foi realizado o PCR para detecção dos genes-alvo de interesse (*Nfatc1*, *Oscar*, *Trap*, *Mmp-9* e *Ctsk*) (Quadro 4) e a expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados, que foram analisados pelo método delta(delta Ct). Este experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente. Os períodos de 3 e 5 dias foram selecionados a partir dos resultados de experimento de time course avaliando os períodos de maior expressão dos genes alvos após estímulo com RANKL (dados não apresentados).

Quadro 4: Referências dos ensaios de expressão gênica (*primers* e sondas pré-desenhados) do sistema TaqMan utilizados

Nome do Gene	Nome do Gene TaqMan Gene Expression Assays
Gapdh	Mm99999915_g1
Acp5 (Trap)	Mm00475698_m1
Oscar	Mm01338227_g1
Nfatc1	Mm01265944_m1
Ctsk	Mm004804039_m1
Mmp-9	Mm00442991_m1

Fonte: elaboração própria

3.5 Papel da Chalcona na Ativação das Vias de Sinalização Intracelular (Western Blot)

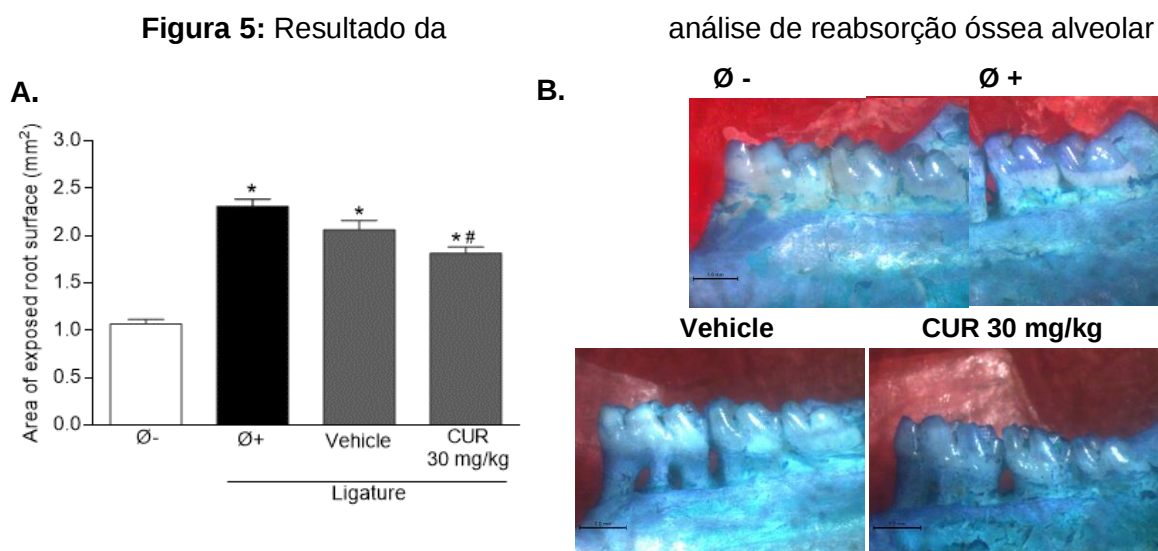
Com objetivo de investigar os efeitos da chalcona sobre a fosforilação das vias de sinalização intracelular NF- κ B, p38 MAPK, Erk e AkT, macrófagos foram plaqueados na concentração de 3×10^5 células/poço com α -MEM suplementado, em placas de 35 mm, e após 24 horas desinduzidas com meio de cultura contendo 0,3% de soro fetal bovino por 6 horas, e então estimulados com RANKL por 10 e 40 minutos, com e sem pré-tratamento (30 min antes) com a chalcona em diferentes concentrações (1, 2.5, 5 ou 10 μ M). Ao final do período experimental, o meio foi aspirado, as placas lavadas com PBS 1x e adicionado RIPA Buffer suplementado com inibidor de fosfatase e protease em cada placa. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad). Para realização do Western Blot

foram utilizadas 20 µg de proteína total por amostra, conforme protocolo descrito anteriormente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários (p-p38 #9211 Cell Signaling, p38 #9212 Cell Signaling, p-Akt #9275 Cell Signaling, Akt #9272 Cell Signaling, p-nfkb #3033 Cell Signaling, nfkb #sc8008 Santa Cruz, p-Erk #4376 Cell Signaling e Erk #9102 Cell Signaling) overnight. Os resultados foram obtidos pela análise densitométrica das bandas e normalizados através da razão entre a forma fosforilada e não fosforilada da proteína alvo. O experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente.

APÊNDICE B – OUTROS RESULTADOS

1 OBJETIVO ESPECÍFICO (i): RESULTADOS CONTENDO O GRUPO TRATADO COM CURCUMIN

1.1 Avaliação da Perda/Reparo Ósseo por Azul de Metileno

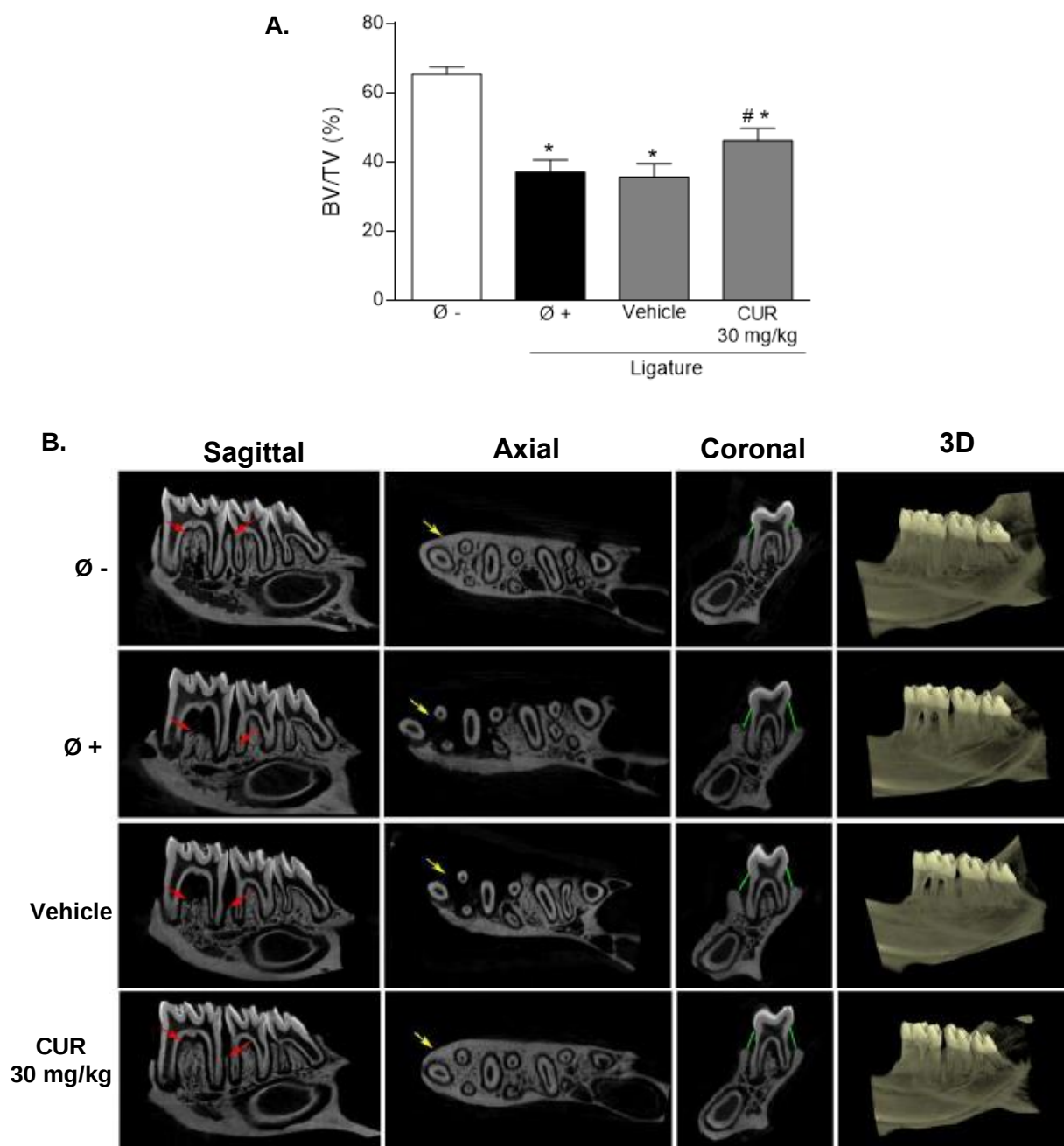


Curcumin reduziu a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por ligadura (n=8). (A) Resultado quantitativo da análise da área de superfície radicular exposta demonstrando que a administração de curcumin 30 mg/kg reduziu de maneira estatisticamente significante ($p < 0,0001$) a reabsorção óssea na área de interesse. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de 8 animais por grupo. (*) significa diferença estatisticamente significante em relação ao Ø-, e (#) significa diferença estatisticamente significante em relação ao Ø+. (B) Imagens representativas de cada grupo experimental obtidas no aumento de 1,25X.

Fonte: Elaboração própria

1.2 Avaliação da Perda/Reparo Ósseo por Microtomografia Computadorizada (μ CT)

Figura 6: Resultado da análise de reabsorção óssea alveolar



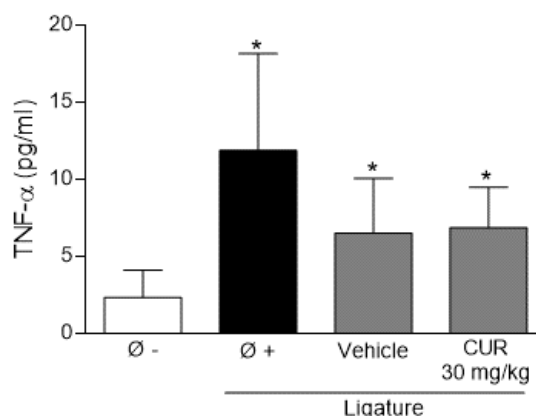
Curcumin previniu a perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por ligadura (n=8). (A) Resultado quantitativo da fração de volume ósseo (VO/VT), com ROI na área de furca do primeiro molar inferior que se estende do topo da furca até os ápices radiculares, demonstrando que a administração de curcumin 30 mg/kg preveniu de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) a reabsorção óssea induzida pela ligadura na região de interesse, quando comparado com o Ø+. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão médio (SEM) de 8 animais por grupo. (*) significa

diferença estatisticamente significativa em relação a Ø-, e (#) significa diferença estatisticamente significativa em relação ao Ø+. (B) Imagens representativas de cada grupo experimental obtidas nos planos sagital, axial, coronal e tridimensional.

Fonte: Elaboração própria

1.3 Determinação da Expressão Gênica em Nível Proteico (ELISA)

Figura 7 - Produção de TNF- α nos tecidos gengivais

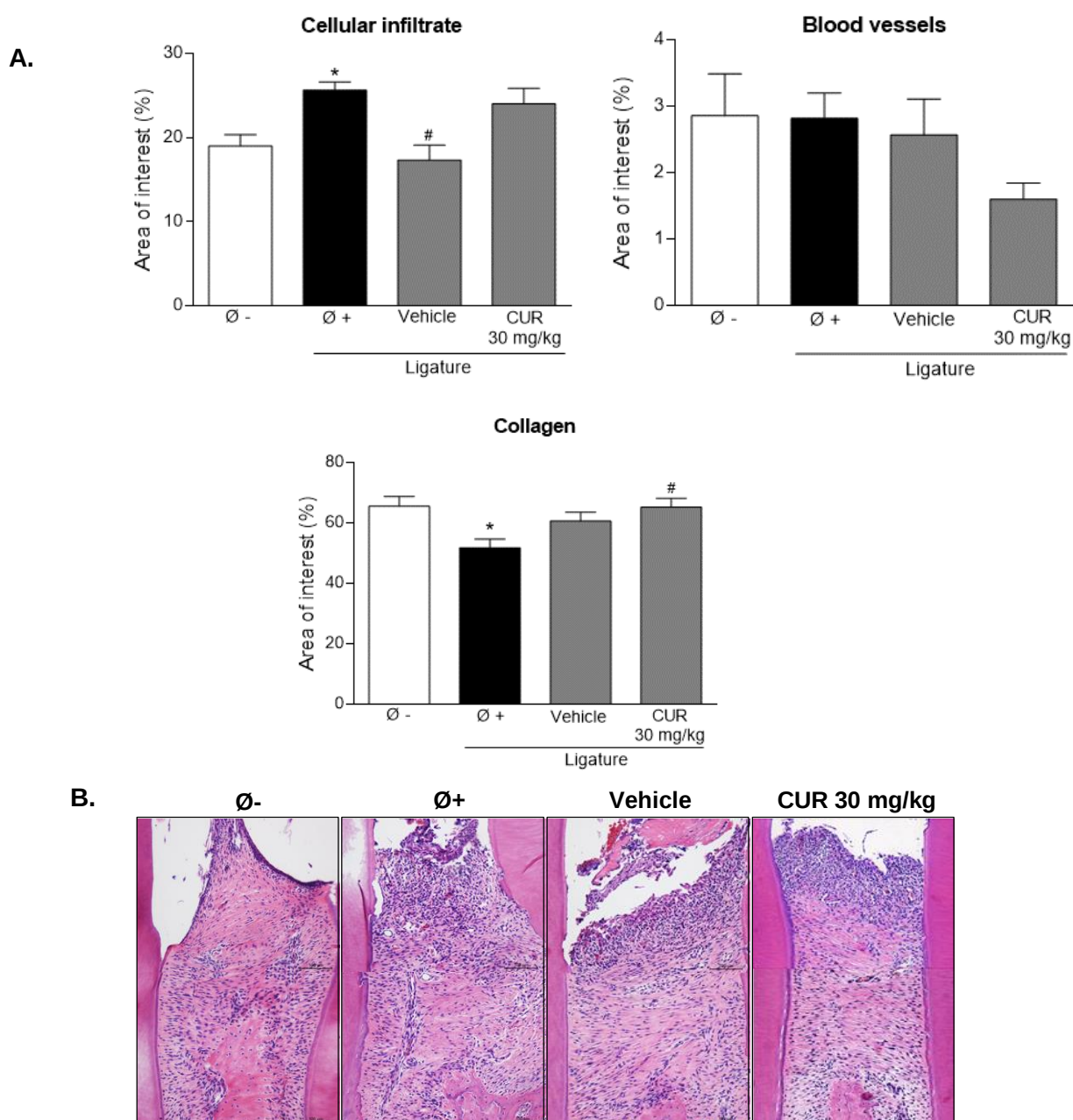


Curcumin reduziu a produção de TNF- α em relação ao grupo Ø+, mas essa diferença não atingiu significância estatística. Os níveis de TNF- α foram induzidos pela colocação da ligadura, e administração oral de curcumin (30mg/kg) reduziu essa hiperexpressão. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e os resultados normalizados a partir da curva padrão do kit (pg/ml). Foram utilizadas 40 ug de proteína total por amostra. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM) de quatro animais por grupo avaliados em duplicata. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Ø-, $p < 0,02$.

Fonte: Elaboração própria

1.4 Análise Estereométrica

Figura 8 - Análise estereométrica dos componentes teciduais

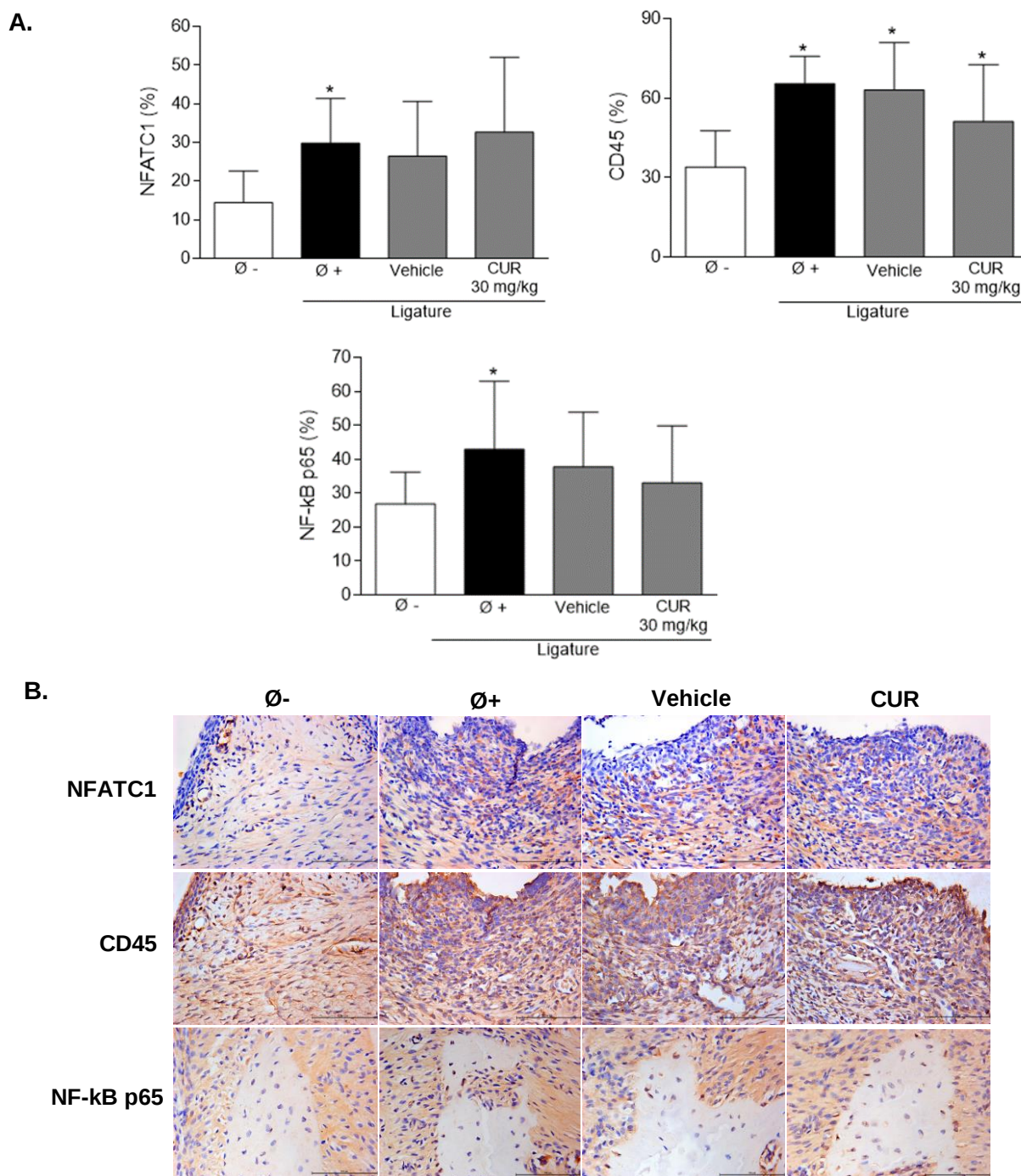


Curcumin aumentou o conteúdo colágeno e reduziu o número de vasos sanguíneos em relação ao grupo Ø+ . (A) Análise estereométrica dos componentes teciduais: curcumin na dose de 30 mg/kg aumentou o conteúdo colágeno quando comparado ao grupo Ø+ ($p < 0,007$) e reduziu discretamente a proporção de vasos sanguíneos. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de 4 animais por grupo. (#) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Ø+, e (*) em relação ao grupo Ø-. (B) Aspecto histológicos dos grupos experimentais. Imagens obtidas em magnificação de 200x.

Fonte: Elaboração própria

1.5 Detecção de Marcadores Ósseos e de Mediadores Inflamatórios por Imuno-histoquímica

Figura 9 – Análise das reações de imuno-histoquímica

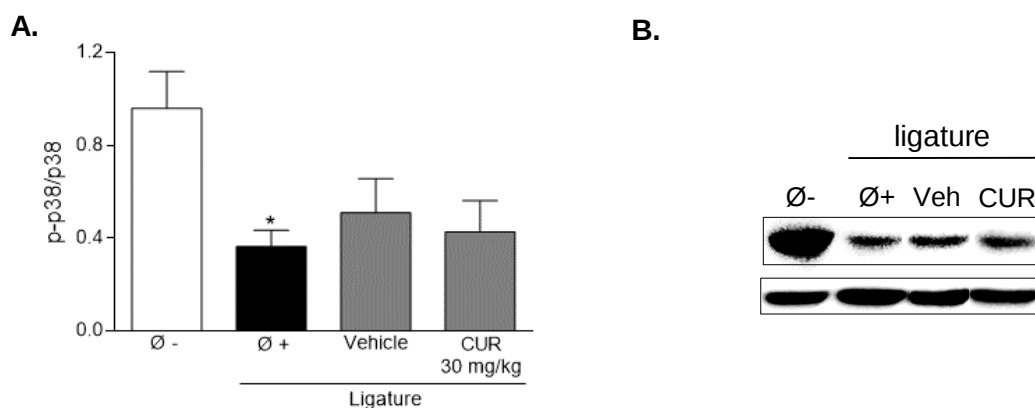


Curcumin não alterou a expressão de NF-kB, NFATC1 e CD45 na região de interesse analisada. (A) Proporção das células positivamente marcadas com os anticorpos para NF-kB, NFATC1 e CD45. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de 4 animais por grupo. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Ø-, $p < 0,002$. (B) Imagens das reações de imuno-histoquímica dos grupos experimentais obtidas em magnificação de 400x.

Fonte: Elaboração própria

1.6 Western Blot

Figura 10 – Efeito do curcumin na ativação da via de sinalização intracelular p38



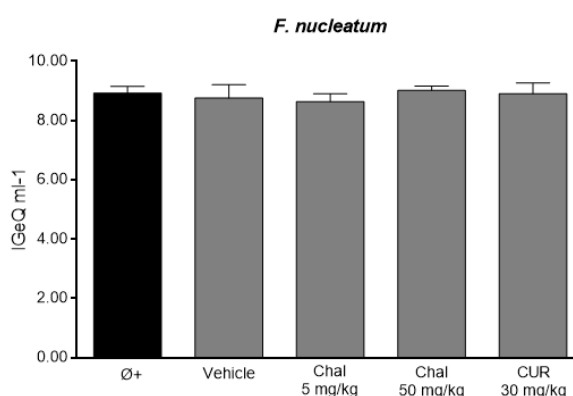
Curcumin não teve efeito sobre a ativação da via de sinalização intracelular p38. **A:** As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (SEM) da quantificação densitométrica de 3 experimentos independentes. **B:** Imagem densitométrica das bandas de western blot. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Ø -, $p < 0,01$.

Fonte: Elaboração própria

1.7 Análise Microbiológica

Não observamos amplificação das amostras para *Pg* e *Aa*.

Figura 11 – Análise microbiológica das ligaduras



Chalcona T4 e curcumin não alteraram a quantidade da bactéria *Fn* presente na ligadura. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de 5 animais por grupo. DNA extraído do biofilme presente nas ligaduras foi utilizado para detecção da expressão das bactérias *Pg*, *Aa* e *Fn*, entretanto, a presença de *Pg* e *Aa* não foram detectadas nas amostras. De acordo com o gráfico, o tratamento com os compostos não alterou a expressão de *Fn*.

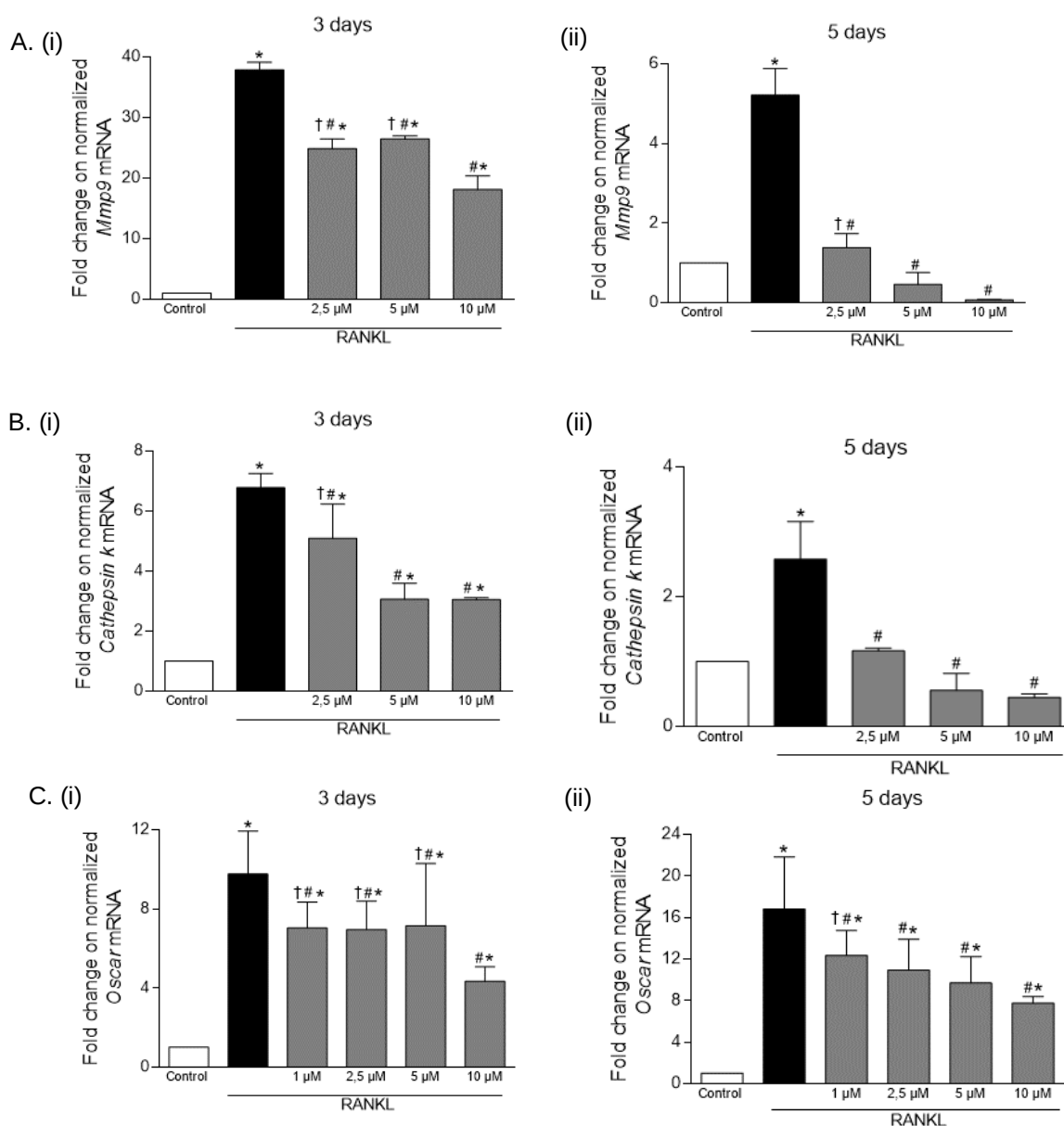
Fonte: Elaboração própria

2 OBJETICO ESPECÍFICO (ii)

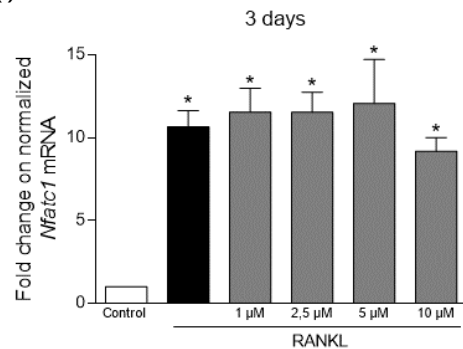
Os dados apresentados a seguir não foram incluídos na Publicação 1 porque serão apresentados em um artigo adicional

2.1 Avaliação dos Efeitos da Chalcona T4 Sobre a Expressão Gênica de Marcadores Ósseos (RT-qPCR)

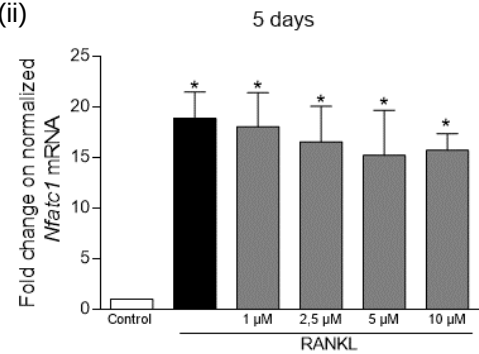
Figura 12 – Efeito da Chalcona T4 na expressão gênica de marcadores ósseos em células RAW 264.7 estimuladas com RANKL



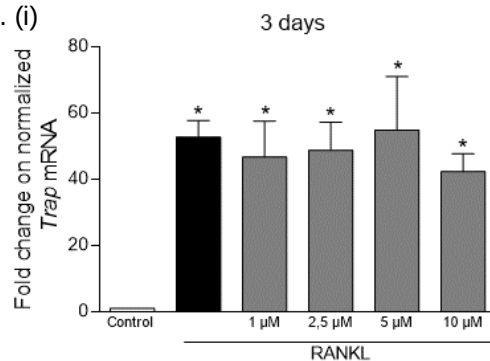
D. (i)



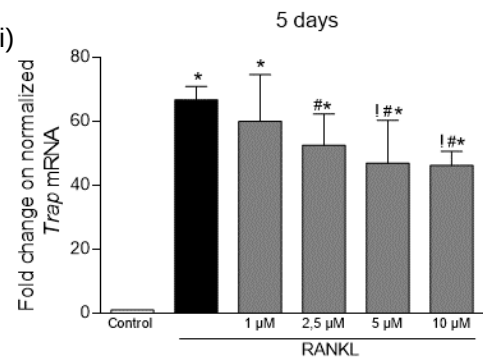
(ii)



E. (i)



(ii)

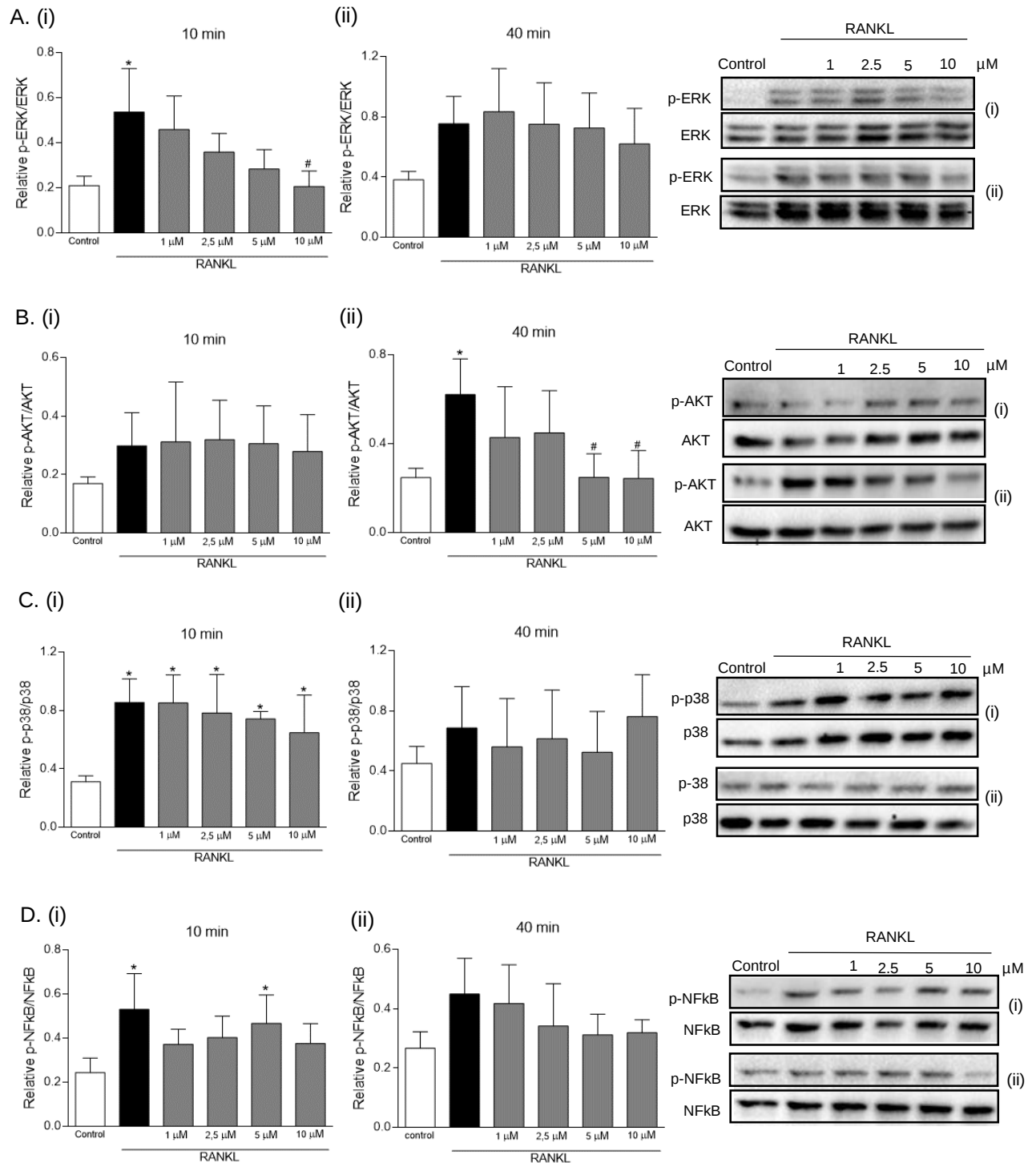


Chalcona T4 inibe a expressão gênica de marcadores ósseos em células RAW 264.7 estimuladas com RANKL. Efeito da chalcona T4 na expressão gênica de *Mmp9* (A), *Cathepsin k* (B), *Oscar* (C), *Nfatc1* (D) e *Trap* (E). A chalcona inibiu de maneira significativa a expressão gênica de *Mmp9*, *Cathepsin k* e *Oscar* no terceiro e quinto dia após estímulo com RANKL ($p < 0,0001$), e somente no período mais tardio (quinto dia) a expressão de *TRAP*. A expressão de *Nfatc1* não foi alterada pelo tratamento com a chalcona. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, (#) em relação ao grupo tratado com RANKL, (†) em relação ao grupo 10 μM e (!) em relação ao grupo 1 μM. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Fonte: Elaboração própria

2.2 Papel da Chalcona T4 na Ativação das Vias de Sinalização Intracelular (Western Blot)

Figura 13 – Efeito da chalcona na ativação de vias de sinalização intracelular em células RAW 264.7 estimuladas com RANKL nos períodos de 10 min e 40 min



Chalcona T4 inibe a ativação de vias de sinalização intracelular. (A) Efeito da chalcona na ativação de pERK; (B) AKT; (C) p38 e (D) NFκB, após 10 min (i) de estímulo com RANKL

ou 40 min (ii). Após 10 minutos a chalcona inibiu a ativação de Erk estimulada por RANKL, de maneira dose-dependente, e após 40 minutos reduziu a ativação de Akt . Ativação de NFkB foi discretamente modulada de maneira dose-dependente pelo composto, aos 10 e 40 minutos. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de três experimentos feito em duplicata. (*) indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle; (#) indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo RANKL.

Fonte: Elaboração própria

ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA

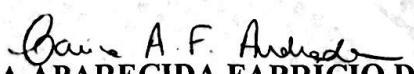


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada ***"AVALIAÇÃO DE UMA NOVA CHALCONA SOBRE A REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA"***, registrada com o nº 18/2018, sob a responsabilidade do(a) **Dr(a). Morgana Rodrigues Guimarães Stabili** – 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 28/08/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss/Ratos Holtzman
Nº de animais	51 (15 Camundongos/ 36 Ratos)
Peso/Idade	Camundongos 25-30g – 06 semanas Ratos 90-110g – 08 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Camundongos) Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Ratos)


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

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

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 26 de março de 2020.

Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes