



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

LUIZA TELES BARBALHO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXICUMARINA COMO AGENTE
TERAPÊUTICO EM MODELO DE PERIODONTITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Feira de Santana, BA
2025

LUIZA TELES BARBALHO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXICUMARINA COMO AGENTE
TERAPÊUTICO EM MODELO DE PERIODONTITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz
Co-orientadora: Profa. Dra Cristiane Flora Villarreal

Feira de Santana, BA
2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

F441a

Ferreira, Luiza Teles Barbalho

Avaliação da 7-hidroxycumarina como agente terapêutico em modelo de periodontite experimental induzida por lipopolissacarídeo / Luiza Teles Barbalho Ferreira. – 2025.

88 f.: il.

Orientador: Paulo José Lima Juiz

Coorientadora: Cristiane Flora Villarreal

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2025.

1. Periodontia. 2. Reabsorção óssea. 3. Composto bioativo. 4. Controle inflamatório. 4. Umbeliferona. I. Título. II. Juiz, Paulo José Lima, orient. III. Villarreal, Cristiane Flora, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 616.314

LUIZA TELES BARBALHO FERREIRA

“Avaliação da 7-hidroxycumarina como agente terapêutico em modelo de periodontite experimental induzida por lipopolissacarídeo”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 29 de maio de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **PAULO JOSE LIMA JUIZ**
Data: 03/06/2025 11:02:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Paulo José Lima Juiz**

UFRB

Documento assinado digitalmente
 **ISABELA CERQUEIRA BARRETO**
Data: 29/05/2025 17:55:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Isabela Cerqueira Barreto**

UFPA

Documento assinado digitalmente
 **SORAYA CASTRO TRINDADE**
Data: 02/06/2025 22:36:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Soraya Castro Trindade**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **VIVIANE ALMEIDA SARMENTO**
Data: 31/05/2025 19:13:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membra: Prof^a. Dr^a. **Viviane Almeida Sarmento**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **Fulvio Borges Miguel**
Data: 29/05/2025 23:00:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Fulvio Borges Miguel**

UFBA

À minha família: Meus filhos Maria Luiza e Arthur, meu esposo Marcio, meus pais Gilberto e Genialda e minha avó Luiza (*in memoriam*) por todo amor e pelo apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o professor Dr Paulo José Lima Juiz (UFRB), por sua brilhante orientação, por confiar em meu potencial, me oferecer as condições necessárias para que o trabalho fosse desenvolvido, por toda paciência e amizade.

À minha co-orientadora, a professora Dra Cristiane Flora Villarreal (UFBA), por ter aberto as portas do seu laboratório, oferecido sua equipe para me dar suporte e treinamento e por toda dedicação durante esse tempo.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (LAFTE/UFBA), que me auxiliaram durante o trabalho experimental.

Ao professor Dr José Carlos de Oliveira Filho (UFRB) pelo suporte com a análise histológica.

Aos professores do PPGBiotec, em especial à professora Dra Soraya Castro Trindade (UEFS), por todo apoio dado durante o desenvolvimento desse trabalho.

À equipe do Biotério da UEFS pelo suporte técnico no desenvolvimento de parte da experimentação animal.

À colega de curso Gabrielly Sobral Neiva por todo apoio e pela amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

A periodontite tem etiologia multifatorial, onde a resposta imune ao desafio microbiano resulta em inflamação dos tecidos gengivais, ativação de osteoclastos e reabsorção do osso alveolar, culminando com a perda do elemento dental, o que mostra a importância do controle inflamatório. Nesse contexto, compostos ativos isolados de plantas medicinais, como a 7-hidroxycumarina (7HC), poderiam ser uma alternativa promissora. Este trabalho iniciou com a avaliação do estado da arte, por meio de uma prospecção tecnológica no banco de patentes Orbit, sobre o potencial biotecnológico da 7HC. A prospecção tecnológica foi dividida em duas fases. A primeira avaliou o potencial biotecnológico da 7HC de modo geral utilizando a sintaxe de busca (umbelliferone)/ti/ab/clms/keyw or (7hydroxycoumarin)/ti/ab/clms/keyw), sendo ti=Título, ab=ABSTRACT e clms =Reivindicação. A segunda fase avaliou o potencial biotecnológico na odontologia utilizando a sintaxe de busca ((umbelliferone)/ti/ab/clms/keyw AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC), sendo a classificação A61Q-011/00, relacionada a produtos usados para o cuidado bucal. A prospecção tecnológica realizada, mostrou que a 7HC (ou umbeliferona) apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e estimulam a síntese de colágeno, o que pode contribuir para o tratamento clínico da doença periodontal. Diante disso, este trabalho objetivou avaliar a ação terapêutica da 7HC, nas concentrações 50 mg/kg e 100 mg/kg, no tratamento da doença periodontal induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em modelo animal. Adicionalmente, foi realizado um estudo comparativo do modelo de indução da doença periodontal com administração de LPS no tecido gengival entre as linhagens Swiss e C57BL/6. Os camundongos foram divididos em grupos de acordo com o tipo de tratamento e a indução da doença periodontal foi realizada por meio da injeção em dias alternados, no tecido gengival, de 1µl de LPS (20µg/µl). A 7HC, nas concentrações 50 mg/kg e 100 mg/kg, foi administrada uma vez ao dia, do 14º ao 28º dia. Amostras de tecido gengival foram coletadas para avaliar a expressão de importantes marcadores presentes na doença periodontal ativa por meio de ELISA e qRT-PCR e as maxilas foram removidas para avaliar a reabsorção óssea por meio da coloração com azul de metileno 1%. Os resultados mostraram que a 7HC, nas duas concentrações testadas, inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, MMP-9 e TIMP-1) e a 100mg/kg estimulou a expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-β), contribuindo também para reduzir a perda de nível ósseo alveolar. Portanto, este trabalho aponta a 7HC como um bioativo promissor na terapia periodontal. O estudo comparativo entre as linhagens de camundongos Swiss e C57BL/6 mostrou que, na linhagem Swiss, a periodontite inicia precocemente, a partir do 7º dia de indução e evolui de maneira mais agressiva quando comparada a linhagem C57BL/6, sugerindo que, a depender do objetivo da pesquisa, usar a linhagem Swiss pode otimizar tempo e custo operacional.

PALAVRAS-CHAVE: doença periodontal, anti-inflamatório, reabsorção óssea, modelo animal, umbeliferona.

ABSTRACT

Periodontitis is characterized by a multifactorial etiology, wherein the immune response to microbial challenges triggers inflammation of the gingival tissues. This response leads to the activation of osteoclasts and subsequent reabsorption of the alveolar bone, ultimately resulting in the loss of dental elements. This phenomenon highlights the crucial importance of effective inflammatory control in managing periodontitis. Within this context, bioactive compounds extracted from medicinal plants, such as 7-hydroxycoumarin (7HC), represent a promising alternative. This endeavor commenced with an evaluation of the current state of knowledge, achieved through a technological prospecting analysis utilizing the Orbit patent database to explore the biotechnological potential of 7HC. The technological prospecting was structured into two distinct phases. The initial phase involved an evaluation of the biotechnological potential of 7-hydroxycoumarin (7HC) in a general context, utilizing the following search syntax: (umbelliferone)/ti/ab/clms/keyw OR (7hydroxycoumarin)/ti/ab/clms/keyw, where "ti" denotes Title, "ab" refers to Abstract, and "clms" indicates Claim. The subsequent phase focused on assessing the biotechnological potential of 7HC, specifically within the field of dentistry. This evaluation was conducted using the search syntax: (umbelliferone)/ti/ab/clms/keyw AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC, with the classification A61Q-011/00 being associated with products utilized for oral care. The conducted technological assessment demonstrated that 7HC, also referred to as umbelliferone, exhibits anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties, in addition to stimulating collagen synthesis. These attributes may play a significant role in the clinical treatment of periodontal disease. Consequently, the objective of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of 7HC at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg in an animal model of periodontal disease induced by lipopolysaccharide (LPS). Additionally, a comparative study was conducted to assess the induction of periodontal disease in two mouse strains, Swiss and C57BL/6, through the administration of lipopolysaccharide (LPS) in the gingival tissue. The mice were categorized into groups based on the type of treatment received. Periodontal disease induction was achieved by administering 1 μ l of LPS (20 μ g/ μ l) into the gingival tissue on alternate days. 7HC was administered daily at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg from day 14 to day 28 of the study. Gingival tissue samples were collected to assess the expression of key biomarkers associated with active periodontal disease, utilizing both ELISA and qRT-PCR methodologies. Furthermore, the maxillae were excised to evaluate bone resorption, using staining with 1% methylene blue. The findings demonstrated that 7HC, at both concentrations examined, effectively inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, MMP-9, and TIMP-1. Additionally, at a dosage of 100 mg/kg, 7HC stimulated the expression of anti-inflammatory cytokines, namely IL-10 and TGF- β , which contributed to a reduction in alveolar bone loss. This study presents 7HC as a promising bioactive compound for use in periodontal therapy. The comparative analysis of the Swiss and C57BL/6 mouse strains indicates that periodontitis in the Swiss strain commences at an earlier stage, specifically on the seventh day post-induction, and progresses with greater severity compared to the C57BL/6 strain. This finding suggests that, depending on the research objectives, utilizing the Swiss strain may yield advantages in terms of reducing both time requirements and operational costs.

KEYWORDS: periodontal disease, anti-inflammatory, bone resorption, animal model, umbelliferone.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO I - Potencial terapêutico da umbeliferona no manejo da doença periodontal	14
Abstract	15
Resumo	16
Resumen	16
1 Introduction	17
2 Methodology	18
3 Results and discussions	19
4 Conclusion	27
References	29
CAPÍTULO II - Inibição da reabsorção óssea e efeito anti-inflamatório da 7-hidroxycumarina em modelo animal de doença periodontal induzida por lipopossacarídeo	33
Abstract	34
1 Introduction	35
2 Materials and Methods	37
2.1 Ethical Aspects	37
2.2 Experimental section	37
2.3 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	39
2.4 Real-Time PCR	40
2.5 Analysis of Alveolar Bone Resorp	40
2.6 Statistical analysis	41
3 Results and Discussion	41
4 Conclusions	48
References	49
CAPÍTULO III - Perda de nível ósseo alveolar induzida por lipopolissacarídeo: um estudo comparativo entre as linhagens de	

camundongo Swiss e C57BL/6	56
Resumo	57
Abstract	57
1 Introdução	58
2 Metodologia	60
3 Resultados	64
4 Discussão	72
4 Conclusão	76
Referências	78
CONCLUSÕES GERAIS	80
REFERÊNCIAS	81
Anexo 1- Certificado de aprovação CEUA.....	84
Anexo 2- Comprovante de cadastro no SisGen.....	85

INTRODUÇÃO GERAL

A doença periodontal é uma condição inflamatória resultante de uma infecção na qual a composição do biofilme microbiano desempenha um papel significativo. O acúmulo de biofilme na margem gengival inicia uma resposta inflamatória que, por sua vez, causa alterações na composição microbiana e pode levar a consequências drásticas no periodonto de indivíduos suscetíveis (KÖNÖNEN *et al*, 2019).

A resposta imune descrita é direcionada aos microrganismos chave (periodontopatógenos), resultando em ativação de osteoclastos e reabsorção patológica do osso alveolar, com consequente perda do elemento dental (GRAVES *et al*, 2011; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

Quando a condição periodontal progride para um estado de doença inflamatória crônica, destrutiva e irreversível é classificada como periodontite (GASNER E SCHURE, 2022). Dados sobre a epidemiologia indicam que a periodontite, na sua forma mais grave, é a sexta doença humana mais comum e afeta 9,8% da população adulta global (GBD 2017 ORAL DISORDERS COLLABORATORS *et al.*, 2020).

Nos Estados Unidos a periodontite, em seus diversos estágios, é um distúrbio comum que afeta mais de 40% dos adultos (EKE *et al* 2018). No Brasil, os dados do Projeto Saúde Bucal 2023, indicam que o percentual de indivíduos com algum problema periodontal varia de acordo com a faixa etária. Entre os adolescentes de 15 a 19 anos, o estudo indicou que 48,66% apresentam doença periodontal. Com relação aos adultos, a avaliação da prevalência de cada condição periodontal separadamente demonstrou que o cálculo dentário foi a condição mais frequente, presente em 54,13% dos participantes de 35 a 44 anos de idade, enquanto que a forma mais grave da doença atingiu 16,87% dos participantes (BRASIL, 2024).

Nas últimas décadas, várias linhas de pesquisa têm apoiado a existência de uma relação entre a periodontite e a saúde sistêmica, onde a doença pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento ou agravamento de diabetes e doenças cardiovasculares (LICCARDO *et al*, 2019), de complicações gestacionais (PEREIRA; VILELA JUNIOR, 2022), de acidente vascular cerebral isquêmico (CARDOSO *et al*, 2021), de Alzheimer (MATSUSHITA *et al*, 2020) e

de diversas outras patologias, o que torna a doença periodontal um importante problema de saúde pública.

No ambiente bucal existem nichos ecológicos onde os microrganismos se estabelecem em comunidades consorciadas (CARVALHO-FILHO; TRINDADE, 2024). A disbiose bucal ocorre quando o equilíbrio natural entre o hospedeiro e seu microbioma bucal muda para um estado de desequilíbrio conhecido como disbiótico (KAHHAROVA *et al.*, 2023), resultado de mudanças ambientais e fatores fisiológicos relacionados ao hospedeiro (KILIAN *et al.*, 2016 *apud* KAHAROVA *et al.*, 2023), bem como o tipo de dieta (CARVALHO-FILHO; TRINDADE, 2024).

O estado de disbiose torna o biofilme bucal mais virulento, com consequente exacerbação da inflamação periodontal (LANG; BARTOLD, 2018; LIU *et al.*, 2022). Para tratá-la é necessário fazer a redução da população microbiana subgengival por meio da remoção mecânica do biofilme dental através da raspagem e alisamento radicular, entretanto o depósito bacteriano em bolsas periodontais profundas é frequentemente difícil de ser removido, necessitando assim de métodos cirúrgicos e antibioticoterapia associada (KWON *et al.*, 2021)

O uso de antissépticos principalmente a base de clorexidina e a utilização de medicamentos sistêmicos para controle da infecção e diminuição da inflamação têm sido usados de maneira a complementar o tratamento, porém o que se observa é que embora eficiente, o colutório a base de clorexidina apresenta alguns efeitos colaterais como manchamento extrínscico do esmalte dentário, hiperplasia de papilas linguais, perda do sentido da gustação, descamação de mucosa (KUMAR *et al.*, 2013), aumento do depósito de cálculo (SAKAUE *et al.*, 2018) e disbiose do microbioma oral (BROOKES *et al.*, 2023).

Além disso, a literatura já reporta a resistência a antibióticos em patógenos associados a doença (ZHU *et al.*, 2023), o que mostra a necessidade de terapias alternativas e/ou adjuvantes ao tratamento convencional (MILUTINOVICI *et al.*, 2021) e neste sentido as plantas medicinais parecem ser uma alternativa.

Dentre os compostos ativos isolados de plantas medicinais, as cumarinas tem demonstrado um potencial promissor. Elas compreendem uma importante classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal

(DAWIDOWICZ *et al*, 2018) e possuem múltiplas atividades biológicas como antioxidante (KANIMOZHI *et al*, 2011; WU *et al*, 2022), antiinflamatório (VASCONCELOS *et al*, 2009) e antimicrobiano (JURD *et al*, 1971; SOARES *et al*, 2021). Dentre as cumarinas, a 7-hidroxicumarina (7HC), também conhecida como umbeliferona, é um importante representante devido às diversas atividades bioquímicas e farmacológicas já identificadas (KORNICKA *et al*, 2023).

Desta forma, estudar o potencial da 7HC como um tratamento adjuvante a terapia periodontal é essencial, e neste contexto, o uso de animais para experimentação pode trazer contribuições importantes, isso porque, na periodontologia, a complexa resposta imune do hospedeiro frente ao processo infeccioso, principal responsável pela reabsorção óssea e perda dentária, não pode ser reproduzida em experimentos *in vitro*, tornando os modelos animais úteis para esse tipo de estudo (KANTARCI *et al*, 2015).

Com base no exposto, antes de iniciar o planejamento deste estudo foi realizada uma prospecção tecnológica sobre o potencial farmacológico da 7-hidroxicumarina. Esta prospecção embasou a decisão sobre a utilização do bioativo no experimento que será descrito a seguir.

Esta tese foi dividida em três capítulos, os quais foram escritos segundo as normas das revistas as quais foram submetidos. A ordem de apresentação dos artigos foi a ordem cronológica em que o experimento foi realizado, sendo:

O capítulo 1 – Intitulado: “Potencial terapêutico da umbeliferona no manejo da doença Periodontal” traz uma prospecção tecnológica em bancos de patentes sobre a aplicação tecnológica da 7HC (umbeliferona) no desenvolvimento de produtos.

O capítulo 2 – Intitulado: “Inibição da reabsorção óssea e efeito anti-inflamatório da 7-hidroxicumarina em modelo animal de doença periodontal induzida por lipopolissacarídeo” traz a atividade anti-inflamatória da 7HC e seu potencial em controlar a perda do nível ósseo alveolar em camundongos com doença periodontal induzida por Lipopolissacarídeo (LPS).

O capítulo 3 – Intitulado: “Perda de nível ósseo alveolar induzida por lipopolissacarídeo: um estudo comparativo entre as linhagens de camundongo Swiss e C57BL/6” traz um estudo comparativo do modelo de doença periodontal induzida por injeção de LPS no tecido gengival, entre as linhagens de

camundongos Swiss e C57BL/6.

Ao final, são apresentadas as conclusões gerais sobre os resultados encontrados na tese.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios do composto bioativo 7-hidroxycumarina (7HC, umbeliferona) e sua capacidade de prevenir a reabsorção óssea alveolar em um modelo animal de doença periodontal induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Realizar uma prospecção tecnológica sobre o uso de 7HC para tratamento da doença periodontal;
- b) Comparar a reabsorção óssea alveolar em modelo animal de periodontite experimental induzida por LPS entre as linhagens de camundongos Swiss e C57BL/6;
- c) Avaliar a produção de citocinas IL- β e IL-6 e a expressão de RNAm das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β e dos marcadores MMP-9, TIMP-1, em tecido gengival excisado de camundongos da linhagem C57BL/6 tratados com 7HC nas concentrações de 50 mg/kg e 100 mg/kg;
- d) Analisar a eficácia do composto 7HC sobre a perda óssea alveolar após tratamento em camundongos com periodontite experimental induzida por LPS.

CAPÍTULO I

Potencial terapêutico da umbeliferona no manejo da doença periodontal

Artigo publicado no periódico **Cuadernos de Educación y Desarrollo**

DOI: 10.55905/cuadv17n4-139

Receipt of originals: 3/21/2025

Acceptance for publication: 4/11/2025

Therapeutic potential of umbelliferone in the management of periodontal disease

Potencial terapêutico da umbeliferona no manejo da doença periodontal

El potencial terapéutico de la umbeliferona en el tratamiento de la enfermedad periodontal

Luiza Teles Barbalho Ferreira

PhD Student in Biotechnology

Institution: Federal University of Recôncavo of Bahia

Address: CETENS/UFRB, Rua Godofredo Rebello de Figueiredo Filho, 697, Feira de Santana – Bahia, Brazil, CEP: 44085-132

E-mail: luiza@ufrb.edu.br

Cristiane Flora Villareal

PhD in Pharmacy

Institution: Federal University of Bahia

Address: Rua Barão de Jeremoabo, 147, Ondina, Salvador – Bahia, Brazil, CEP: 40170-115

E-mail: cfv@ufba.br

Paulo José Lima Juiz

PhD in Biotechnology

Institution: Federal University of Recôncavo of Bahia

Address: CETENS/UFRB, Rua Godofredo Rebello de Figueiredo Filho, 697. Bairro SIM. Feira de Santana – Bahia, Brazil, CEP: 44085-132

E-mail: limajuiz@ufrb.edu.br

ABSTRACT

Periodontal disease has a multifactorial etiology. The immune response to bacterial infection leads to the activation of osteoclasts, resulting in the resorption of alveolar bone and, ultimately, tooth loss. Standard clinical treatments typically include scaling and root planing, which may or may not involve surgical procedures and are often supplemented with antibiotics and antiseptic chlorhexidine to control the growth of periodontal pathogens. However, research indicates that chlorhexidine can produce adverse effects, and many periodontal pathogens have developed antibiotic resistance. Given these challenges, bioactive compounds derived from medicinal plants, particularly coumarins, present promising alternative treatment options. Coumarins are organic compounds classified as benzopyrones and are sourced from plants in the Apiaceae and Rutaceae families and some fungi. This study seeks to explore the therapeutic potential of umbelliferone for the treatment of periodontitis using the Orbit patent database, employing the search syntax: (umbelliferone)/TI/AB/CLMS/KEYW AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC). Umbelliferone has shown potential in developing advanced therapeutic products for periodontal treatment and preventing periodontitis. Its remarkable biological properties—anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial effects, and the ability to stimulate collagen synthesis—may significantly enhance clinical strategies for managing periodontitis.

Keywords: Periodontal disease, patent, umbelliferone, antimicrobial, antiinflammatory.

RESUMO

A doença periodontal tem etiologia multifatorial. A resposta imune ao desafio microbiano resulta na ativação dos osteoclastos e na reabsorção óssea alveolar, culminando na perda do elemento dentário. O tratamento clínico preconizado inclui a raspagem e alisamento radicular com ou sem procedimentos cirúrgicos, associados ao uso de antibióticos e antisséptico clorexidina, no controle do crescimento de patógenos periodontais. No entanto, estudos mostram que a clorexidina apresenta efeitos adversos e os periodontopatógenos já apresentam resistência aos antibióticos. Nesse contexto, compostos bioativos isolados de plantas medicinais, incluindo as cumarinas, mostram-se promissores. Cumarinas são compostos orgânicos classificados como benzopironas, isolados de plantas da família Apiaceae e Rutaceae, bem como fungos. Este estudo tem como objetivo explorar o potencial terapêutico da umbeliferona para o tratamento da periodontite na Bancos de dados de patentes Orbit, usando uma sintaxe de pesquisa descrita como (umbelliferone)/TI/AB/CLMS/KEYW AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC). A umbeliferona demonstrou potencial no desenvolvimento de produtos tecnológicos avançados para terapia periodontal e na prevenção da periodontite, devido às suas notáveis propriedades biológicas, incluindo suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, e propriedades estimulantes da síntese de colágeno, o que pode contribuir para o tratamento clínico da periodontite.

Palavras-chave: Doença periodontal, patente, umbeliferona, antimicrobiano, antiinflamatório.

RESUMEN

La enfermedad periodontal tiene una etiología multifactorial. La respuesta inmune al desafío microbiano da como resultado la activación de los osteoclastos y la resorción del hueso alveolar, culminando en la pérdida del elemento dental. El tratamiento clínico recomendado incluye raspado y alisado radicular con o sin procedimientos quirúrgicos, asociado al uso de antibióticos y antiséptico con clorhexidina, sin controlar el crecimiento de patógenos periodontales. Sin embargo, los estudios muestran que la clorhexidina tiene efectos adversos y los periodontopatógenos ya son resistentes a las bacterias. En este contexto, los compuestos bioactivos aislados de plantas medicinales, incluidas las cumarinas, son prometedores. Las cumarinas son compuestos orgánicos únicos, como las benzopironas, aislados de plantas de la familia Apiaceae y Rutaceae, así como de hongos. Este estudio tiene como objetivo explorar el potencial terapéutico de la umbeliferona para el tratamiento de la periodontitis en las bases de datos de patentes de Orbit, utilizando una sintaxis de búsqueda descrita como (umbeliferona)/TI/AB/CLMS/KEYW AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC). La umbeliferona ha demostrado potencial en el desarrollo de productos tecnológicos avanzados debido a la terapia periodontal y la prevención de la periodontitis, sus notables propiedades biológicas, incluidas sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y propiedades estimulantes de la síntesis de colágeno, que pueden contribuir al tratamiento clínico de la periodontitis.

Palabras clave: Enfermedad periodontal, patentar, umbeliferona, antimicrobiana, antiinflamatoria.

1 INTRODUCTION

Coumarins are organic compounds classified as benzopyrones, distinguished by a benzene ring fused to a pyrone ring. They are ubiquitously present in nature, particularly in plants from the Apiaceae family (such as parsley and coriander) and the Rutaceae family (citrus fruits), as well as in microorganisms and fungi (ALTHUNIBAT *et al.*, 2022). Chemically, they possess fluorescent properties and a structure that makes them amenable to various synthetic modifications, rendering them appealing for diverse applications, particularly in pharmacology. Their biological and pharmacological significance has been extensively studied due to their multifaceted biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial (MATOS, 2009).

The exploration of coumarins in medicine dates back to the early 20th century when their anticoagulant properties were discovered. Notably, dicoumarin, a plant derivative, served as the basis for developing warfarin, one of the most commonly used anticoagulants globally (Anguita-Sanchez *et al.*, 2016). Beyond their anticoagulant properties, other coumarin derivatives have exhibited substantial potential for drug development owing to their diverse biological activities, including anticancer, antiviral, antithrombotic, and neuroprotective properties. This extensive array of activities positions coumarins as promising candidates for further therapeutic research (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Umbelliferone, also known as 7-hydroxycoumarin, is a phenolic compound widely distributed in various plant species, particularly in the Apiaceae and Rutaceae families. Structurally, it consists of a benzene ring fused with a lactone ring and a hydroxyl group at position 7, giving rise to significant biochemical and pharmacological properties, making it a molecule of interest in pharmaceutical and chemical research (JOY *et al.*, 2020).

Studies have shown that umbelliferone has antioxidant (JOY *et al.*, 2020), anti-inflammatory (ZHANG *et al.*, 2017), and antimicrobial properties (DARLA *et al.*, 2015), making it potentially helpful in treating a wide range of conditions.

One area of significant interest in umbelliferone research is its antioxidant properties. This compound can counteract reactive oxygen species (ROS), implicated in various chronic diseases such as cancer, diabetes, and cardiovascular disease. By providing electrons to neutralize these free radicals, umbelliferone helps to protect cells

from oxidative damage, acting as a preventive measure against oxidative stress and its associated complications (TRAYKOVA; KOSTOVA, 2005). These properties hold promise for addressing a wide range of health concerns and have sparked considerable attention within the scientific community, including using Umbelliferone to develop an alternative treatment for periodontitis.

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that impacts the tissues supporting the teeth. It occurs due to the body's response to a dysbiotic bacterial biofilm (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2012). Managing this condition involves targeting pathogenic bacteria and controlling local inflammation. For instance, Coumarins have demonstrated antimicrobial properties against periodontopathogens like *Porphyromonas gingivalis*, which is associated with periodontitis (HE *et al.*, 2022). Additionally, apart from reducing bacterial load, Umbelliferone's antioxidant properties are believed to aid in gum healing by neutralizing reactive oxygen species (ROS) linked to oxidative stress from oral inflammation (TRAYKOVA; KOSTOVA, 2005).

Umbelliferone, a compound with remarkable qualities, shows promise in the development of advanced formulations for the treatment of periodontitis and the enhancement of oral health. Its antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties position it as a candidate for inclusion in various dental products, such as toothpaste, mouthwashes, and topical medications, designed to not only inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and proteases responsible for breaking down connective and bone tissue but also to regulate the oral microbiota, thereby preventing plaque accumulation effectively. This article aims to highlight the significant technological advancements detailed in patent repositories that revolve around the pharmacological potential of Umbelliferone.

2 METHODOLOGY

The research thoroughly explored patent databases and scientific journal websites with a qualitative and quantitative approach. For patent mapping, the study relied on the Orbit Intelligence database, a product of Questel Orbit Inc., a pioneering company in this field since the 1970s. This database, which encompasses publications from nearly a hundred countries and patent authorities, provided a reliable and comprehensive source of data.

Initially, a search, in august 2024, to evaluate the general technological landscape related to umbelliferone was performed, regardless of the area of knowledge. The syntax for accessing data on patents related to umbelliferone for product and process development was (UMBELLIFERONE)/TI/AB/CLMS/KEYW OR (7 HYDROXYCOUMARIN)/TI/AB/CLMS/KEYW). This search aimed to identify all relevant documents without any exclusion criteria or time constraints, using as keyword (KEYW) UMBELLIFERONE OR HYDROXYCOUMARIN, entered in the fields TI=TITLE, AB=ABSTRACT and CLMS=CLAIMS of the search site.

The number of patents, as well as the technological domains, product developments and countries where the patents were filed, were used to analyze the documents.

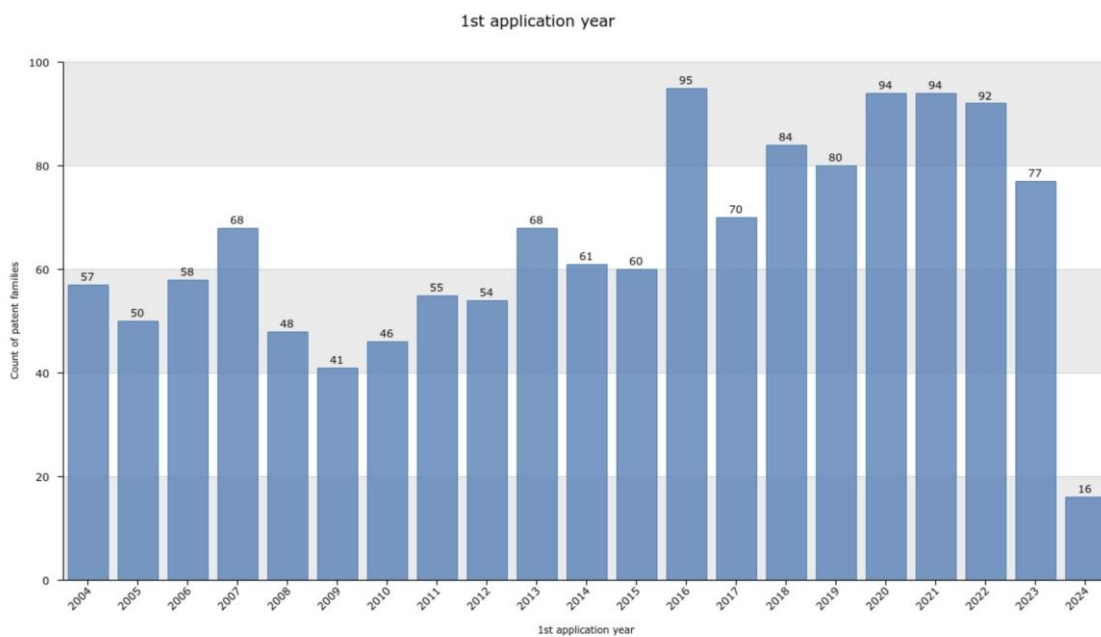
Finally, to focus on the study's objective of presenting technological advancements in the use of umbelliferone in dentistry, a specific search syntax was used, (umbelliferone)/TI/AB/CLMS/KEYW AND (A61Q-011/00)/IPC/CPC), where A61Q-011/00 indicates the international classification of patents for products and processes related to oral care preparations, dentifrices, antiseptics. This syntax excluded duplicate patents, those unrelated to the study's objective, as well as patents related to processes for extracting bioactive substances and devices used for administration.

3 RESULTS AND DISCUSSIONS

Umbelliferone demonstrates various beneficial biological activities. Studies suggest that its antioxidant capacity directly results from a hydroxyl group on the benzene ring, allowing it to act as a free radical scavenger, particularly relevant in the treatment of diseases associated with oxidative stress, such as neurodegenerative and chronic inflammatory diseases (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; FORMAN *et al.*, 2021). Additionally, umbelliferone's anti-inflammatory activity occurs through the inhibition of pro-inflammatory mediators, such as the cytokines TNF and IL-6, protecting rats against acetic acid-induced ulcerative colitis through upregulation of SIRT1/PPAR γ signaling with subsequent inhibition of NF- κ B-p65 activity or downregulation of the p38MAPK/ERK signaling in addition to preventing reactive oxygen species (ROS) generation (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2022), making it a promising candidate for the treatment of inflammatory diseases, including periodontitis.

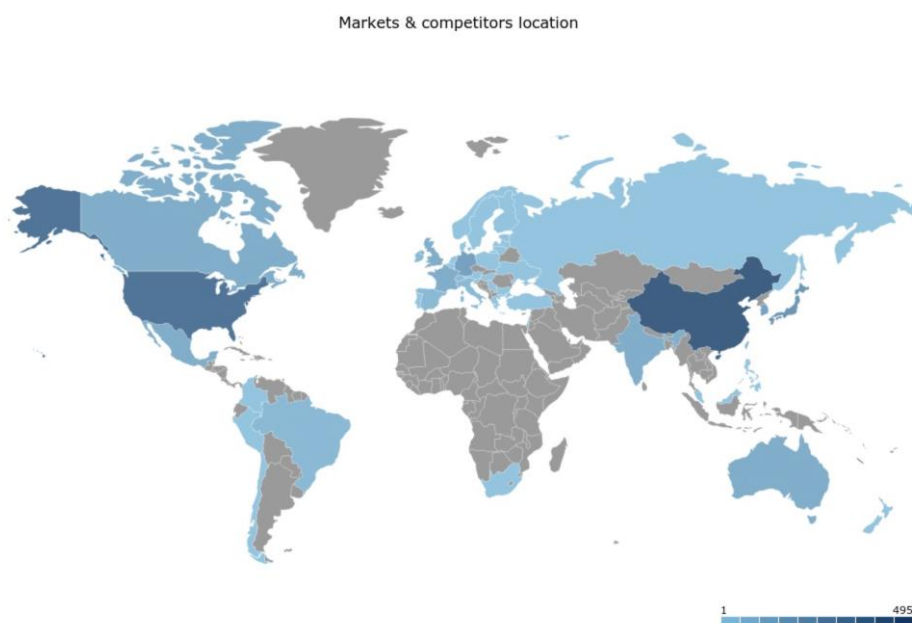
The results shows that 2000 patents have been filed for various umbelliferone activities in the last 20 years, with 2016 having the highest number of patents filed. Figure 1 outlines the development of products and processes related to the use of umbelliferone. Investments in research and development have been consistent since 2004, with the United States and China receiving the most patent deposits (Figure 2).

Figure 1 - Count of patent families related to the use of umbelliferone



Fonte: Elaborado pelos autores

Figure 2 – Displays patent locations and markets for umbelliferone.



Fonte: Elaborado pelos autores

The market for developing medicines based on natural compounds has been steadily growing, driven by the global demand for safer and more effective therapies. Owing to its promising therapeutic potential, umbelliferone has garnered significant attention from pharmaceutical industries in the United States and China. Both countries have invested in research and development (R&D) focused on new medicines containing umbelliferone, leveraging their robust biotechnology infrastructures, expansive consumer markets, and government incentives for healthcare innovation (RESEARCHNESTER, 2024)

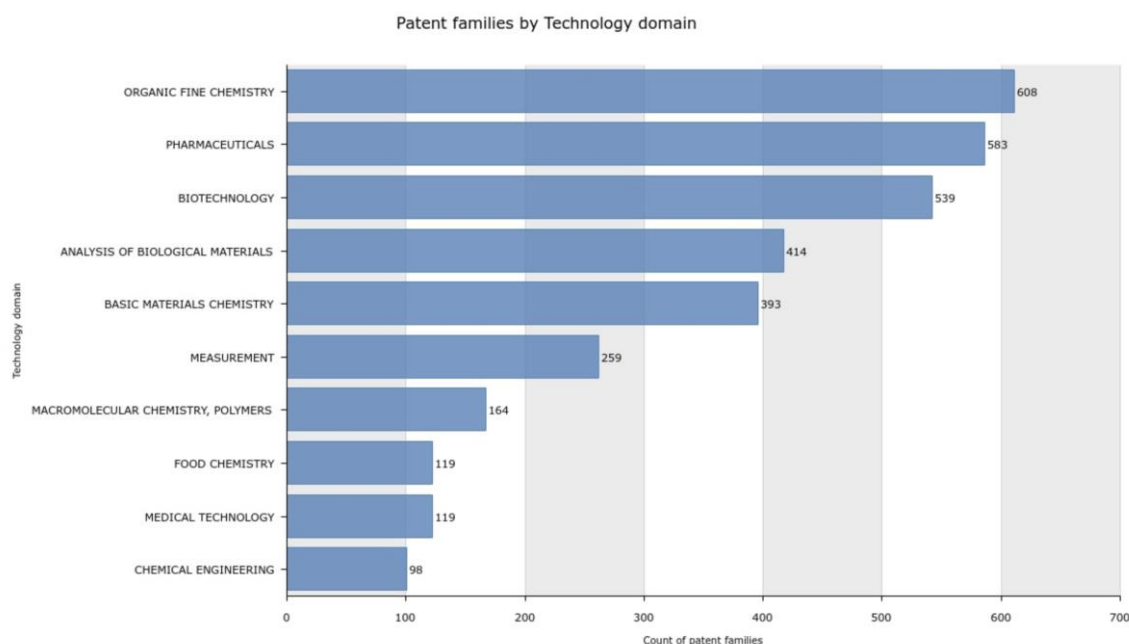
In the United States, the market for herbal medicines and natural compounds, including umbelliferone, receives substantial support from academic institutions, biotechnology companies, and the private sector. According to a 2022 report by Grand View Research, the global herbal medicines market, encompassing umbelliferone, was valued at US\$93.9 billion in 2020, with a projected annual growth of 7.2% by 2028. Biotechnology startups and major pharmaceutical companies in the US have invested in bioactive compound screening platforms to develop new treatments.

Additionally, there is a growing collaboration between the private sector and regulatory agencies such as the Food and Drug Administration (FDA). The FDA has worked to expedite the approval of new plant-based medicines through initiatives like the FDA Botanical Drug Development Program. This program has encouraged the development of medicines based on substances like umbelliferone, providing regulatory support and easing the transition from academic research to the market (FDA.GOV, 2016).

In China, the market for herbal medicine is thriving due to the longstanding tradition of traditional Chinese medicine (TCM). The Chinese government has strongly supported research into bioactive compounds of plant origin, specifically emphasizing integrating traditional medicine with Western pharmacological approaches. Domestic statistics suggest that China's R&D investment totalled 1.4 trillion RMB in 2015, with an R&D intensity of 2.1% of GDP, and 41.3% of enterprises are engaged in innovation activities (PHIRDA, 2017).

Figure 3 illustrates the main areas exploring umbelliferone as a raw material for product development. The results indicate that the organic fine chemistry, pharmaceuticals and biotechnology sectors are the most significant investors in research and development. However, despite this bioactive potential, dentistry still needs to explore it.

Figure 3 – Patent families by technological domain.



Fonte: Elaborado pelos autores

Umbelliferone has been the subject of various biological activities outlined in patent documents. This article aims to explore the patents pertaining to its anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm properties. These attributes are of particular interest in the context of developing novel therapies for periodontal disease.

Periodontitis is an inflammatory condition caused by bacteria buildup in a dysbiotic biofilm (PAPAPANOU *et al.*, 2017). In response to the bacteria and their toxins, the body releases various proinflammatory substances such as cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-1ra, IL-10, and IL-12), matrix metalloproteinases (MMPs), prostaglandin E2 (PGE2), as well as the activation of T and B cell lymphocytes, and polymorphonuclear leukocytes (NIELD-GEHRIG *et al.*, 2011). The immune response can damage the supporting structures of the teeth, including connective tissue, periodontal ligament fibers, and alveolar bone (TONETTI *et al.*, 2018; BUI *et al.*, 2019).

There is compelling evidence linking oxidative stress with the exacerbation of the inflammatory process and progression of periodontitis. Reactive oxygen species (ROS) are partially reduced or excited forms of atmospheric oxygen (Halliwell and Gutteridge, 2007). The most commonly generated are hydroxyl radicals (OH $\cdot$), hydrogen peroxide, nitric oxide (NO $\cdot$), peroxides, peroxyxynitrite, singlet oxygen, superoxides (Kalyanaraman *et al.*, 2012), and reactive chlorine species, such as

hypochlorous acid (HOCl) (BISWAS, 2016). ROS production occurs in normal cellular metabolism, cell signaling, and metabolic processes. Several functions are attributed to ROS, including gene expression, cell proliferation, cell death, cell migration, and inflammation (XIANG and FAN, 2010). However, an overproduction of ROS due to an imbalance between the production of oxidants and antioxidant defenses may damage biological systems, a process called oxidative stress, leading to extensive tissue damage (Abdulkareem *et al.*, 2023), inhibiting oxidative stress is essential, as mounting evidence suggests that it plays a crucial role in developing various types of chronic inflammation, including periodontitis (NGUYEN *et al.*, 2017).

Antioxidants, with their ability to scavenge free radicals and serve as redox agents, play a crucial role in bodily protection. Thus, the quest to discover such antioxidants has emerged as a critical pursuit in the fields of biology, medical science, chemistry, and pharmaceuticals.

In line with this idea, the patent document (CN102775374) outlines a coumarin compound, its preparation method, and its application in the medicinal sciences. The compound can exist as either 4-methyl-7-hydroxy-8- (3-fluorobenzoyl) coumarin or 4-methyl-7-hydroxy-8- (4-fluorobenzoyl) coumarin. Additionally, the patent covers the use of the compound as an antioxidant.

Another patent document (US20190388490) focuses on plant extractions, compositions containing them, and their various uses. It emphasizes the significance of plant extracts in cosmetic and pharmaceutical preparations, particularly in terms of storage stability and dermatological compatibility. The specific plant extracts, including Bacopa, Centella, Jatropha, Aegle, Terminalia, Phyllanthus, and Spilanthes, either individually or in combinations, play a pivotal role in enhancing skin and hair care, protecting against environmental influences, and promoting antioxidative stress applications and repair of damaged skin and hair.

Although the aforementioned documents do not directly pertain to periodontitis treatment, they emphasize the antioxidant properties of coumarins, particularly Umbelliferone, and highlight the potential of utilizing this compound in developing products for oral care, as outlined in the document (EP2760547)—antioxidant compositions for treatment of inflammation or oxidative damage.

The invention (EP2760547) introduces an oral antioxidant composition designed to improve the health of human gingival fibroblasts. These fibroblasts may be affected by copper released from dental devices in a patient's mouth. The

composition is applied topically to the soft oral tissue and contains between 0.0001% and 5.0% w/w of at least one antioxidant. The antioxidants used may include a combination of (i) resveratrol, ferulic acid, and tetrahydrocurcuminoids, (ii) phloretin, ferulic acid, and resveratrol, or (iii) phloretin, ferulic acid, and tetrahydrocurcuminoids. Additionally, the composition includes a pharmaceutically acceptable carrier with a pH of at least 5.0. Overall, the oral antioxidant composition aims to enhance the viability of human gingival fibroblasts compromised by copper released from a dental device in the patient's mouth.

A pharmaceutical composition described in document CN106620270 treats periodontitis using antioxidants and anti-inflammatory properties. The composition is made from specific raw drugs in precise proportions, including calanthe puberula, Staphylea pinata, inulin, vernonia, and umbelliprenin. This method offers several benefits, such as reducing the periodontal probing depth by less than 30%, significantly decreasing gingival swelling and congestion, minimizing secretion in the periodontal pocket, improving tooth stability without restoring chewing force, providing noticeable relief from halitosis and overall alleviating symptoms.

The document (DE19634959) "Ointment for Treating Wounds" provides a versatile solution for a wide range of conditions, including gingivitis, abscesses, acne, arthritis, leg ulcers, blisters, burns, dermatitis, eczema, foot fungus, hemorrhoids, insect bites, rashes, herpes, muscle pain, pimples, warts, nail inflammation, cuts, abrasions, sunburn, sprains, diaper rash, wounds, and bedsores, among other skin and hair issues. The formula consists of 60 g of ointment containing 50 g of white petroleum jelly, 7 ml of tea tree oil, 1.5 ml of chamomile oil, 1.5 ml of marigold oil, 1 ml of wheat germ oil, and 1 ml of mantle oil. It may also contain Cerotin, Matricin, Camazulene, Bisabolol, Stearin, Palmitic Acid, Linoleic Acid, Triacetin, Phytosterol, Salicylic Acid, Umbelliferone, Umbelliferone Methyl Ether, Apigenin, Luteolin, Apigenin, Bitter Substances, Mucilages, Anthemol, Rutin, Hyperoside, and Coumarin.

Umbelliferone demonstrates antimicrobial properties, as outlined in the patents, an important activity since a dysbiotic dental bacterial biofilm engenders an exacerbated immune response, culminating in the degradation of the teeth' support tissue, encompassing the connective tissue, periodontal ligament fibers, and alveolar bone.

The process of bacterial dental biofilm formation begins when bacteria attach reversibly to teeth and then use their pili to irreversibly attach to tooth surfaces, forming

colonies to stabilize their attachment (BARNIER *et al.*, 2021). Dental biofilm early colonizers typically include facultative anaerobes and saccharolytic species, while late colonizers are usually proteolytic obligate anaerobes. As a "bridge organism" between early and late colonizers, *Fusobacterium nucleatum* allows subgingival colonization of a diverse microbial community (BÎRLUȚIU *et al.*, 2017; VANDANA *et al.*, 2022), including periodontopathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, and *Eikenella corrodens* (DARVEAU, 1997). During this process, a self-produced matrix of extracellular polymeric substance (EPS) acts as a protective shell, shielding the bacteria from external pressure (ZEINELDIN *et al.*, 2023). The dysbiotic biofilm arises from the disruption of the homeostasis described.

The presence of biofilm can offer crucial mechanical protection to bacterial communities. Therefore, compounds that can inhibit biofilm formation and exhibit bactericidal or bacteriostatic activity hold great promise. For instance, Umbelliferone has shown potential as an agent with antimicrobial and antibiofilm properties, as evidenced in the patents uncovered in this study.

For example, in the patent document (IN202241054405) titled "Composition for Biofilm Inhibition and Process Thereof," a biofilm-inhibiting composition is described, containing 0.005% to 0.008% carvacrol by weight and 0.002% to 0.005% Umbelliferone by weight. The weight ratio of carvacrol to Umbelliferone ranges from 1:0.4 to 1:1. Additionally, the document outlines a process for preparing the biofilm-inhibiting composition. This composition is relevant to pharmaceutical preparations and comprises phytochemicals with biofilm inhibition properties.

The document IN202241054402 titled "Antibiofilm composition and its preparation" discloses a composition containing 0.002% to 0.008% (w/w) of coumarin and 0.002% to 0.005% (w/w) of Umbelliferone with coumarin and Umbelliferone in a weight ratio range of 1:0.25 to 1:2.5. Additionally, the disclosure includes a process for preparing the composition, which involves blending an emollient, a first emulsifier, and a surfactant in water within a specific temperature range. This disclosure aims to provide a safe and effective composition derived from phytochemical sources, demonstrating significant antibiofilm activity against *P. aeruginosa*. This composition is particularly important for managing challenging wound infections.

The patent CN111333774 is entitled "Antibacterial Hydrogel Based on Coumarin Skeleton and Preparation Method and Application Thereof." This patent details the preparation method for an antibacterial hydrogel based on a coumarin skeleton. The process involves using 4-hydroxymethyl-7-hydroxycoumarin or its derivatives along with acryloyl chloride to synthesize a photoinitiator containing the coumarin skeleton. This photoinitiator initiates a cross-linking reaction of an active monomer under illumination conditions, forming the antibacterial hydrogel. The derivative of 4-hydroxymethyl-7-hydroxycoumarin has a specific structural formula, and the active monomer can be one or more of acrylamide, acrylic acid, N-isopropyl acrylamide, 2-hydroxyethyl acrylate, vinyl chloride, styrene, or acrylonitrile.

The patent document CN110743035 described another hydrogel based on coumarin. This hydrogel is capable of intelligently detecting and eliminating pathogenic bacteria. It efficiently detects *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in real time and effectively kills them, addressing the issue of bacterial drug resistance.

The use of patchouli oil, patchouli alcohol, or their derivatives is proposed to inhibit the asexual reproduction of fungi, reduce the adhesion of microorganisms to surfaces, or prepare compositions for treating microbial infections (patent number DE10327134). This innovative approach involves utilizing Umbelliferone (as a UV absorber), patchouli oil, and its derivatives to hinder the growth of pathogenic fungi in humans and reduce the adhesion of microorganisms to various surfaces. The primary objective is to address the limitations of existing methods by preventing the attachment of specific pathogenic fungi and suppressing the formation of pigmented spores, thereby preventing reinfection and the proliferation of infections in humans, animals, and plants. An advantageous attribute of this approach is the reduced concentrations of patchouli oil and its derivatives required compared to alternative agents.

While the patents in question did not demonstrate antimicrobial activity against periodontopathogens, the disclosed Umbelliferone's antimicrobial and antibiofilm properties provide valuable insights for dental research, as evidenced in the patent document "Natural antibacterial toothpaste" - CN105997719. The invention involves formulating a bacteriostatic toothpaste with significant efficacy, comprising specific raw materials in precise proportions. These materials include a plant extract containing Umbelliferone, calcium bicarbonate, silicon dioxide, sodium lauroamphosphosphate PG-acetate, xylitol, sodium phytate, pearl powder, coconut oil alcohol amide, vitamin

C, saccharin sodium, essence, Gemma Agrimoniae, and deionized water. The plant extract combines *Houttuynia cordata* extract and *Stephania delavayi* extract, distinguishing this toothpaste as a natural antibacterial solution. The distinct blend of active ingredients from the plant extract aims to deliver an unexpectedly synergistic antibacterial effect, assuring users of the toothpaste's natural and effective antibacterial properties.

Additional activities not directly associated with the pathogenesis of periodontal disease but essential in its clinical management have been identified. These activities are linked to the analgesic properties of certain compounds. Novel ethers of 7-hydroxycoumarin presented in the patent document US4151291 are currently used as medicines, particularly as analgesics. These compounds have demonstrated potential in treating pain in human patients and can stimulate collagen synthesis, aiding in regenerating periodontal ligament fibers. The patent document JP2022038524, titled "Umbiferon derivative expressing skin cell growth action via VII type collagen increment, and production method," refers to an umbelliferone derivative that stimulates skin epidermal cell proliferation by enhancing collagen VII.

Improvements in oral hygiene habits can reverse gingivitis, but if left untreated, it can progress to periodontitis, involving the destruction of collagen fibers, requiring the insertion of functionally oriented collagen fibers of a newly formed periodontal ligament (XU *et al.*, 2019; STAVROPOULOS *et al.*, 2021). Collagen hydrogels have been extensively researched for periodontal regeneration. While collagen hydrogels are commonly used as membranes for guided tissue regeneration (GTR), studies have also assessed their impact on periodontal regeneration when directly applied to the defect. Research by Sato and colleagues (2004) demonstrated promising results in a dog defect model by applying a collagen gel loaded with FGF-2, resulting in the formation of new collagen fibers and cementum.

4 CONCLUSION

Umbelliferone, also known as 7-hydroxycoumarin, is a highly versatile compound with a wide range of properties that make it biologically active and potentially valuable for various applications. This compound has been the subject of extensive research, development, and innovation, particularly in the United States and China, where many patent filings are concentrated.

Umbelliferone has demonstrated potential in developing advanced technological products for periodontal therapy and in preventing periodontitis, owing to its notable biological properties, including its anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and biofilm formation inhibiting effects. Moreover, it has also been found to possess analgesic and collagen synthesis stimulating properties, which could significantly contribute to the clinical management of periodontitis. Despite these promising findings, there is a scarcity of patent documents related to the use of Umbelliferone in periodontitis treatment, underscoring the imperative need for further scientific exploration into the full potential of this remarkable compound.

Dentists encounter numerous challenges in the clinical management of periodontitis, particularly in cases that are resistant to treatment. Therefore, it is critical to develop new therapeutic alternatives, especially since periodontitis is widely recognized as a public health concern with far-reaching systemic impacts on the overall health and quality of life of affected individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

Postgraduate Program in Biotechnology. State University of Feira de Santana. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (BioproFar-BA, TO - PIE0001/2024)

REFERENCES

- ABDEL-WAHAB, B. A. *et al.* Umbelliferone ameliorates ulcerative colitis induced by acetic acid via modulation of TLR4/NF- κ B-p65/iNOS and SIRT1/PPAR γ signaling pathways in rats. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 25, p. 37644–37659, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35066822/>
- ABDULKAREEM, A. A. *et al.* Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. **Journal of oral microbiology**, v. 15, n. 1, p. 2197779, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37025387/>
- ALTHUNIBAT, O. Y. *et al.* Umbelliferone prevents isoproterenol-induced myocardial injury by upregulating Nrf2/HO-1 signaling, and attenuating oxidative stress, inflammation, and cell death in rats. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 149, n. 112900, p. 112900, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35378502/>
- ANGUITA-SÁNCHEZ, M. *et al.* Perception of physicians on factors that influence the choice of a dicoumarin or a new oral anticoagulant in patients with non-valvular atrial fibrillation. **Atencion primaria**, v. 48, n. 8, p. 527–534, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26971361/>
- BARNIER, J.-P. *et al.* The minor pilin PilV provides a conserved adhesion site throughout the antigenically variable meningococcal type IV pilus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 45, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2109364118>
- BÎRLUȚIU, R.M. *et al.* Bacterial biofilm: a mini-review of an emerging life form of bacteria. **Acta Med. Transilv.** v.22, p.68–71, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322753441_BACTERIAL_BIOFILM_A_MINI-REVIEW_OF_AN_EMERGING_LIFE_FORM_OF_BACTERIA
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26881031/>
- BUI, F. Q. *et al.* Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomedical journal**, v. 42, n. 1, p. 27–35, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987702/>
- DARLA, M. M. *et al.* Synthesis and bio-evaluation of novel 7-hydroxy coumarin derivatives via Knoevenagel reaction. **Research on chemical intermediates**, v. 41, n. 2, p. 1115–1133, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11164-013-1258-1>
- DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 12–32, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9567964/>

FDA.GOV (2016). Botanical Drug Development Guidance for Industry. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/93113/download>>. Acesso em 20/08/2024.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00233-1>

GRAND VIEW RESEARCH (2022). "Herbal Medicine Market Size & Share Report, 2021-2028." **Grand View Research**. Disponível em <<https://www.grandviewresearch.com>>. Acesso em 05/09/2024.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Complement and dysbiosis in periodontal disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 11, p. 1111–1116, 2012. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3439646/>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C., eds. Free radicals in biology and medicine, 5ed, Oxford University Press, 2007. Disponível em: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01757607/document>

HE, Z. *et al.* Anti-biofilm activities of coumarin as quorum sensing inhibitor for *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Oral Microbiology**, v. 14, n. 1, 29 mar. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8967191/>

JOY, M.N.; BODKE, Y.D.; TELKAR, S.; BAKULEV, V.A. Synthesis of coumarins linked with 1,2,3-triazoles under microwave irradiation and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity. **Journal of the Mexican Chemical Society**. v.64, p.53–73, 2020. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2020000100053

KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22027063/>

MATOS, F.J.A. (2009) Introdução a fitoquímica experimental. [Introduction to experimental phytochemistry.] 3rd ed., Edicoes UFC, Fortaleza, 147 p.

NGUYEN, T. T. *et al.* Salivary oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis and acute coronary syndrome. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 7, p. 2345–2353, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987039/>

NIELD-GEHRIG, J. AND WILLMAN, D. "Host Immune Response to Periodontal Pathogens," in **Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist**, 3ed., Philadelphia: Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins, p. 157–170, 2011.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. S1, p. S173–S182, jun. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926951/>

PHIRDA. From imitator to innovator. China pharmaceutical innovation and research development . Disponível em <https://www.nature.com/collections/ssbnlhqwf>. Acesso em 20/09/2024.

RESEARCHNESTER. Research Nester Connect, Lead, Accomplish. Coumarin market size & share by type, application – Global Supply & Demand analysis, Growth forecasts, statistics report 2024-2036. Disponível em <https://www.researchnester.com/reports/coumarin-market/5393#:~:text=Coumarin%20Market%20size%20is%20poised,cardiovascular%20diseases%20across%20the%20globe>. Acesso em: 21/09/2024.

SATO, Y. *et al.* Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 2, p. 243–248, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15068112/>

STAVROPOULOS, A. *et al.* Medium- and long-term clinical benefits of periodontal regenerative/reconstructive procedures in intrabony defects: Systematic review and network meta-analysis of randomized controlled clinical studies. **Journal of clinical periodontology**, v. 48, n. 3, p. 410–430, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7986220/>

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714204/>

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of periodontology**, v. 89 Suppl 1, p. S159–S172, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29926952/>

TRAYKOVA, M.; KOSTOVA, I. Coumarin Derivatives and Oxidative Stress. **International journal of pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 29–32, 2005. Disponível em: <https://scialert.net/fulltext/?doi=ijp.2005.29.32>

VANDANA, D.S. Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. **Carbohydrate polymers**. v.291, p.119536, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35698329/>

XIANG, M.; FAN, J.; FAN, J. Association of Toll-like receptor signaling and reactive oxygen species: a potential therapeutic target for post trauma acute lung injury. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 1–8, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20706658/>

XU, X.-Y. *et al.* Concise review: Periodontal tissue regeneration using stem cells: Strategies and translational considerations. **Stem cells translational medicine**, v. 8, n. 4, p. 392–403, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6431686/>

ZEINELDIN, M. *et al.* Beyond the risk of biofilms: An up-and-coming battleground of bacterial life and potential antibiofilm agents. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 2, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36836860/>

ZHANG, H.-J. *et al.* Pharmacological evaluation of 9,10-dihydrochromeno[8,7-e][1,3]oxazin-2(8H)-one derivatives as potent anti-inflammatory agent. **Pharmacological reports: PR**, v. 69, n. 3, p. 419–425, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273501/>

CAPÍTULO II

**Inibição da reabsorção óssea e efeito anti-inflamatório
da 7-hidroxicumarina em modelo animal de doença
periodontal induzida por lipopolissacarídeo**

INHIBITION OF BONE RESORPTION AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF 7-HYDROXYCOUMARIN IN AN ANIMAL MODEL OF LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED PERIODONTAL DISEASE

Luiza Teles Barbalho Ferreira¹, Renan Fernandes do Espírito Santa², Milena Botelho Pereira Soares³, Cristiane Flora Villarreal⁴, José Maria Barbosa Filho⁵, Paulo José Lima Juiz⁶

- 1 Federal University of Recôncavo of Bahia. Avenida Centenário, 697. Bairro SIM. Feira de Santana – Bahia – Brazil. 44042-280. E-mail: luiza@ufrb.edu.br
- 2 School of Dentistry – University of Maryland Baltimore. 650 West Baltimore Street, Baltimore, MD, USA. E-mail: rfernandes@umaryland.edu.
- 3 Gonçalo Moniz Research Center. Rua Waldemar Falcão, 121 – Candeal, Salvador – Bahia, Brazil. 40296-710. E-mail: milena.soares@fiocruz.br.
- 4 Federal University of Bahia. Faculty of Pharmacy. Rua Barão de Jeremoabo, 147. Ondina, Salvador, Bahia, Brazil. 40170-115. E-mail: cfv@ufba.br
- 5 Federal University of Paraíba. Campus I Lot. Cidade Universitária, Paraíba, Brazil, 58051-900. E-mail: jbarbosa@ift.ufpb.br.
- 6 Federal University of Recôncavo of Bahia. Avenida Centenário, 697. Bairro SIM. Feira de Santana – Bahia – Brazil. 44042-280. E-mail: limajuiz@ufrb.edu.br.

Abstract

Periodontal disease (PD) has a multifaceted etiology. The immune response to microbial invasion triggers osteoclast activation, leading to the resorption of alveolar bone and ultimately resulting in tooth loss. Objective: This study aims to investigate the anti-inflammatory properties of the bioactive compound 7-hydroxycoumarin (7HC) at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg. We seek to evaluate its effectiveness in controlling alveolar bone resorption in treating periodontal disease induced by lipopolysaccharide (LPS) in an animal model. Methodology: Periodontal disease (PD) was induced in C57 Bl/6 mice using a lipopolysaccharide (LPS) injection protocol. The mice were randomly assigned to different treatment groups, receiving 7HC at 50 mg/kg and 100 mg/kg, Nimesulide at 25 mg/kg, and a control group that received the vehicle. Treatments were administered once daily from the 14th to the 28th day of the study. Following this treatment period, the animals were euthanized, and gingival tissue samples were collected to assess cytokine production (IL-1 β and IL-6) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Additionally, mRNA expression levels of MMP-9, TIMP-1, IL-10, and TGF- β were analyzed through qRT-PCR. The maxillae were extracted for the quantification of alveolar bone resorption by measuring the most significant distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest utilizing ImageJ software. Results: The bioactive 7HC effectively inhibited the expression of IL-1 β , IL-6, and MMP-9 while simultaneously increasing the mRNA expression of IL-10 and TGF- β , cytokines recognized for their anti-inflammatory properties. Histometric analysis of the alveolar bone indicated that 7HC protects alveolar bone resorption in an animal model of periodontal disease induced by LPS injection. Conclusion: The bioactive 7HC not only inhibited pro-inflammatory cytokines but also stimulated the expression of the anti-

inflammatory cytokine, thereby preventing bone resorption. This positions 7HC as a promising candidate for periodontal therapy.

Keywords: umbelliferone; immune response; periodontitis.

1 Introduction

Periodontal diseases include a range of inflammatory conditions that affect the protective and supportive structures of the teeth, potentially leading to tooth loss over time [1]. This chronic condition is multifactorial, arising from an immune response to a dysbiotic biofilm in the subgingival area [2]. Both genetic predisposition and environmental factors can significantly influence the progression of periodontitis [3]. The immune response directed at periodontopathogens leads to the activation of osteoclasts, resulting in the pathological resorption of alveolar bone and the subsequent loss of dental elements [4, 5]. This emphasizes the importance of controlling inflammatory processes; thus bioactive compounds extracted from medicinal plants are a viable alternative.

Many studies have established a significant link between periodontitis and overall systemic health in recent decades. This connection indicates that periodontitis can serve as a risk factor for the development or exacerbation of various conditions, including diabetes and cardiovascular diseases [6], complications during pregnancy [7], ischemic strokes [8], and Alzheimer's disease [9], among others. Consequently, periodontal disease is recognized as a significant public health issue.

Antiseptics, particularly those based on chlorhexidine and systemic medications to address infection and inflammation, have become common adjuncts to scaling, root planing, and/or surgical interventions for periodontal disease [10]. However, although chlorhexidine-based mouthwash is effective, it is associated with several side effects, such as xerostomia, hypogeusia, and a discolouration of tongue; as well as calculus and extrinsic tooth staining in long-term use [10,11], and disruption of the oral microbiome [12]. Additionally, existing literature points to antibiotic resistance among pathogens linked to the disease [13], underscoring the necessity for alternative therapies or adjuncts to conventional treatments [14]. In this context, medicinal plants and their bioactive chemical constituents may offer a promising alternative.

Exploring medicinal plants as an adjunctive treatment to scaling and root planing therapy has gained significant attention in dentistry. A study conducted by Gościński et al. [15] highlights that the incorporation of bioactive compounds derived from medicinal plants alongside conventional therapy can enhance treatment efficacy while mitigating the adverse effects commonly associated with traditional agents like chlorhexidine. Furthermore, they discuss various products already available on the market, including toothpaste, antiseptics, and oral sprays, illustrating that phytotherapy is not just a theoretical concept but a practical reality in dental care.

In this context, coumarins, found abundantly in medicinal plants, show significant pharmacological potential. These compounds have antioxidant [16, 17], anti-inflammatory [18], and antimicrobial Properties [19]. Given the role of inflammation in periodontal disease, using natural products like coumarins with anti-inflammatory properties could offer a promising treatment strategy.

Among coumarins, auraptene and lacinartin are polyphenols in the coumarin family. Auraptene has been shown to significantly reduce the secretion of IL-8 and TNF- α in LPS-stimulated macrophages. Similarly, at a 50 μ g/ml concentration, lacinartin also effectively inhibits the secretion of IL-8 and TNF- α . Furthermore, both auraptene and lacinartin contribute to a reduction in the secretion of MMP-8 and MMP-9 [20].

Umbelliferone (7-hydroxycoumarin), a derivative of coumarin, also demonstrates the ability to attenuate the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines in HaCAT cells treated with TNF- α and IFN- γ . This attenuation is mediated through the inhibition of I κ B α degradation, the nuclear translocation of NF- κ B, and the phosphorylation of STAT1, indicating a dose-dependent response to Umbelliferone treatment [21].

Additionally, intravenously injected gelatin-coated ZnO-ZnS core-shell nanoparticles containing 7-hydroxycoumarin (7HC), reduced the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and IL-17, along with prostaglandin E (PEG2) [22].

It is important to highlight that oxidative stress significantly worsens inflammation and accelerates the progression of periodontitis. Umbelliferone (7HC) can effectively scavenge free radicals and inhibit lipid peroxidation [25, 26]. The antioxidant properties of 7HC are likely the result of activating the Nrf2

signaling pathway, which enhances the activities of endogenous antioxidants such as superoxide dismutase, glutathione, catalase, and NAD(P)H-quinone oxidoreductase. [23, 24, 25]

In addition to its anti-inflammatory and antioxidant benefits, 7-hydroxycoumarin has demonstrated the ability to inhibit the formation of biofilms produced by uropathogenic *Escherichia coli* at a concentration of 50 µg/mL. It also effectively reduced biofilm formation by methicillin-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* at a concentration of 500 µg/mL. Considering the significant role that dysbiotic biofilms play in the development of periodontal disease, the antimicrobial properties of 7-hydroxycoumarin show great promise for managing this condition [26, 27].

This study aims to evaluate the anti-inflammatory effects of 7HC and its ability to prevent alveolar bone resorption in an animal lipopolysaccharide (LPS)-induced periodontal disease model.

2. Materials and Methods

2.1 Ethical Aspects

The animal testing conducted in this study received approval from the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) at FIOCRUZ, in accordance with the resolution established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) regarding the responsible use of animals (CONCEA, 2015). This approval is documented under registration number 012/2022.

2.2 Experimental section

The 7-hydroxycoumarin (7HC) active compound collected, extracted, and isolated from *T. domingensis* were previously detailed [28], and used in the present study.

To assess the inhibition of bone resorption and the anti-inflammatory properties of 7HC, periodontal disease was induced in C57Bl/6 mice sourced from the CPqGM Animal Facility at FIOCRUZ – BAHIA. This procedure was modified from the protocol used for inducing periodontal disease as described in reference [29].

The mice had a weight range of 25 to 30 grams and were between 8 and 10 weeks old. They were kept in a temperature-controlled environment (22-25°C)

under a 12-hour light/dark cycle, with unrestricted access to food and water throughout the experimental duration.

The mice were randomly assigned to five distinct groups, with each group consisting of 12 animals: Group 1: Naive group—animals that received no treatment and had no induced periodontal disease; Group 2: Negative control group—animals treated with a vehicle (saline + 5% DMSO) and subjected to induced periodontal disease; Group 3: Animals treated with 7HC at 50 mg/kg and induced periodontal disease; Group 4: Animals treated with 7HC at a 100 mg/kg dosage and induced periodontal disease; Group 5: Positive control group—animals treated with Nimesulide at 25 mg/kg and with induced periodontal disease.

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Ketamine (5 mg/kg) and Xylazine (20 mg/kg). Once adequate anesthesia was achieved, each mouse received 1 µL of 20 µg/µL of lipopolysaccharide (LPS) derived from *Escherichia coli*, diluted in injection water.

This injection was administered into the gingival papilla located between the first and second upper left molars. The procedure was carried out on alternate days over a 21-day period as part of a protocol designed to induce periodontal disease [29].

The methodology, adapted from Trombetta & Silva [29], recommends a four-week injection regimen of 2 µL of LPS (10 µg/µL) isolated from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, diluted in phosphate-buffered saline (PBS). In contrast, this study employed 1 µL of LPS (20 µg/µL) isolated from *Escherichia coli*, diluted in injection water, over the 21-day duration.

A powdered form of 7HC, diluted in a saline solution with 5% DMSO, was utilized to prepare the dosages of 7HC. Beginning 14 days after the onset of disease induction, the mice were treated orally via gavage with 7HC at dosages of 50 mg/kg and 100 mg/kg, or with its vehicle (5% DMSO diluted in saline). Nimesulide (Sigma-Aldrich), a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) commonly used in dentistry to manage inflammatory conditions, served as the gold standard drug in this study [30].

The treatment was administered once daily until the experiment concluded at 28 days. Following the treatment period, the animals in each group were euthanized using a combination of xylazine hydrochloride (1 mg/kg) and

ketamine (15 mg/kg), followed by an anesthetic overdose of sodium thiopental (50 mg/kg) and intravenous administration of potassium chloride (2.56 mEq/kg).

The excised gingival tissue samples were preserved in 1 mL of Trizol and promptly utilized for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays to ensure the integrity of the RNA. In contrast, for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) protocols, the samples were stored in a buffer solution at -80 °C to maintain their viability and prevent degradation.

2.3 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Gingival tissue samples were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) at 100 mg of tissue per mL. Subsequently, the following components were added: 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, and protease inhibitors, which included 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KI of aprotinin A per 100 mL (Sigma). The samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 g, and aliquots of the supernatant were frozen at -80°C for future quantification.

The cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-10 were quantified using the sandwich ELISA technique with DuoSet ELISA Development System kits from R&D Systems (Minneapolis, USA) for each cytokine [31]. Ninety-six-well plates (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) were sensitized by adding 50 microliters of capture antibody (a purified monoclonal antibody specific to the investigated cytokine), diluted in PBS, and incubating at 4°C overnight. The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20. Next, 100 microliters of a 1% PBS-BSA solution were added to each well and incubated for 2 hours at room temperature to block non-specific binding sites. After one additional wash, the plates were incubated with 50 microliters of each sample (in duplicate) and standard cytokines at various concentrations for 12 hours at 4°C.

After washing the plates, biotinylated anti-cytokine antibodies were introduced, and the plates were incubated for an additional 2 hours at room temperature. Following this incubation, the plates were rewashed, and 50 microliters of streptavidin, diluted 1:200, were added for 20 minutes at room temperature. After another wash, the reaction was developed using 50 microliters of a revealing solution composed of 10 mL of 1M citrate-phosphate buffer, two microliters of H₂O₂, and one TMB (tetramethylbenzidine) tablet. The reaction was subsequently blocked by adding 50 microliters of a 1:20 phosphoric acid solution. Optical density was measured using a spectrophotometer (Spectra Max 190 -

Molecular Devices, California, USA) at a wavelength of 450 nm. The analysis was conducted using Softmax 4.3.1 Software (Molecular Devices).

2.4 Real-Time PCR

The mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6, MMP-9, TIMP-1, IL-10, and TGF- β in gingival tissue were assessed using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). RNA was extracted using TRIzol/chloroform reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and its concentration was determined with the Nanodrop 2000 apparatus. According to the manufacturer's instructions, cDNA was synthesized from 1 μ g of RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [32].

For the gene expression assay, the following TaqMan probes were utilized: il1b (Mm_0043228_m1), il6 (Mm_00446190_m1), il10 (Mm_00439616_m1), mmp9 (Mm_00442991_m1), tgfb (Mm_01178820_m1), and timp1 (Mm_01341361_m1), along with negative controls. All reactions were conducted in duplicate and analyzed using the ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) under standardized thermal amplification conditions specified by the manufacturer.

The mean cycle threshold (Ct) value obtained from duplicate measurements was used to calculate the expression level of the target gene. It was done by normalizing with the endogenous gene Gapdh (mm99999915_g1) using the formula $2^{(-\Delta Ct)}$. Any Cts with a coefficient of variation greater than 5% were excluded from the analysis.

2.5 Analysis of Alveolar Bone Resorption

Morphometric analyses were performed to assess alveolar bone resorption associated with the experimental disease. The excised maxillae were fixed in 10% formalin for 24 hours. Subsequently, they were divided into two hemiarches (right and left), meticulously dissected, and stained with 1% methylene blue to differentiate the bone tissue from the teeth, as the latter stains less intensely.

Photographs of the lingual surface of the stained first molars were taken using a Leica camera paired with a stereomicroscope to evaluate the extent of alveolar bone loss following disease induction. The greatest distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest was measured utilizing ImageJ software (National Institutes of Health, USA) [33].

2.6 Statistical analyses

The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) based on analyses conducted with groups of animals. The normality of the data was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. For data that exhibited a normal distribution, comparisons between groups were performed using a one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. Conversely, for data that did not conform to normality, comparisons were made utilizing the non-parametric Friedman test, followed by pairwise post hoc comparisons using the Pairwise method with Bonferroni correction.

The ELISA and RT-PCR results were analyzed using Prism 7 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). At the same time, alveolar bone loss was evaluated using IBM SPSS Statistics software. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3 Results and Discussion

The results of this study indicate that 7HC has anti-inflammatory activity, offering protection against alveolar bone resorption in an animal model of lipopolysaccharide-induced periodontal disease.

To evaluate the effectiveness of inflammation induction via LPS injection, pro-inflammatory cytokine levels of IL-1 β and IL-6 were measured using ELISA. The results demonstrated an increase in the expression of both cytokines in animals with induced periodontal disease treated with the vehicle compared to those in the naive group. This indicates that the animal model employed in the study successfully stimulated active inflammation.

The inflammatory response was controlled by administering the standard drug (nimesulide at 25 mg/kg) and 7HC at 50 mg/kg and 100 mg/kg ($p < 0.0001$). Notably, no statistically significant differences existed between the groups treated with these compounds (Figure 1).

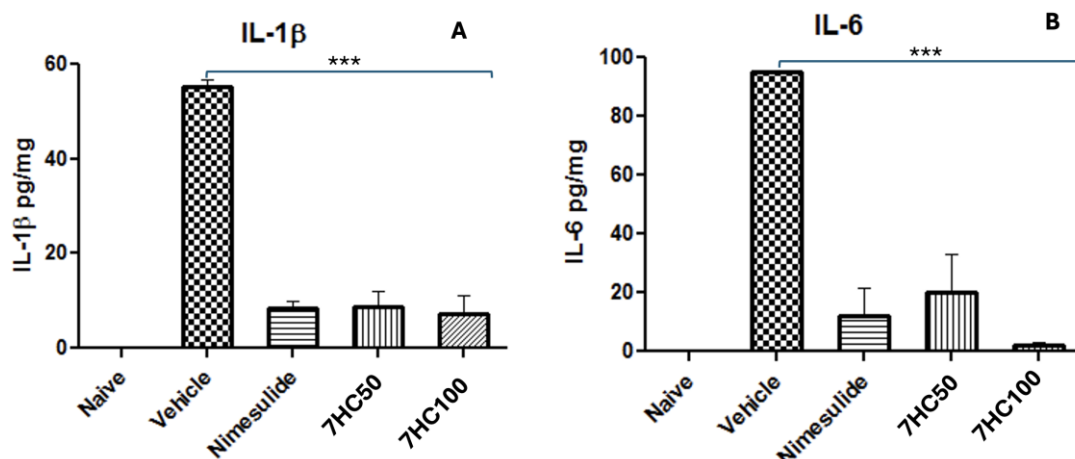


Figure 1. Impact of 7-hydroxycoumarin (7HC) treatment at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg on the expression of pro-inflammatory (A, B) cytokines in gingival tissue excised from C57BL/6 mice with experimental periodontal disease. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance is indicated at $p < 0.0001^{***}$.

In this study, lipopolysaccharide (LPS), a key component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, was used to induce periodontitis. Toll-like receptors (TLRs) identify LPS and initiate the inflammatory response. The TLR-CD14-LPS-MyD88 activation cascade is vital to the innate immune response, particularly in identifying bacterial pathogens. LPS is initially detected by the CD14 receptor, which is present on the surface of immune cells like macrophages and dendritic cells. This interaction enhances the binding of LPS to TLR4, initiating intracellular signaling. Following this activation, the MyD88 protein is recruited to the TIR (Toll/IL-1 receptor) domain of TLR4, which facilitates the assembly of a signaling complex that includes additional adaptor proteins, such as IRAK (Interleukin-1 receptor-associated kinase) and TRAF (TNF receptor-associated factor). Signaling through MyD88 activates a pathway that ultimately leads to the activation of the transcription factor NF- κ B, promoting the transcription of genes that produce inflammatory cytokines, including IL-1 β and IL-6, amplifying the inflammatory response. While this cascade is crucial for the body's defense, it can also damage tissue if not adequately regulated [34,35]

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a key proinflammatory cytokine secreted mainly through monocytes/macrophages and dendritic cells in response to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipopolysaccharide (LPS) [34]. Interleukin-6 (IL-6) is a proinflammatory cytokine and its concentration in gingival

crevicular fluid was elevated in individuals diagnosed with chronic periodontitis compared to those who are periodontally healthy. This suggests a potential link between increased IL-6 levels and the inflammatory processes associated with chronic periodontitis, highlighting the role of this cytokine as a marker of periodontal disease progression [36, 37].

A cohort study [38] comprising 68 patients diagnosed with periodontal disease, carried out from 2021 to 2022, uncovered a positive correlation between heightened levels of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 in the patients' saliva and severe clinical parameters. Specifically, the study found that these elevated cytokine levels were associated with increased probing depth (PPD), indicating the severity of periodontal tissue destruction and a higher plaque index (PI). Additionally, increased bleeding on probing (BOP) was observed, signaling inflammation in the gum tissue. Furthermore, the study revealed a reduction in the clinical attachment level (CAL), highlighting the loss of supportive periodontal tissue and attachment to the teeth.

Treatment with 7HC at 50 mg/kg and 100 mg/kg reduced the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, while increasing the expression of mRNA for anti-inflammatory cytokines. This study revealed that the inflammatory stimulus induced by LPS in animals with periodontal disease, treated with a vehicle, suppressed mRNA expression for the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β . Remarkably, the standard drug nimesulide at a dosage of 25 mg/kg failed to reverse this suppression. In contrast, treatment with 7HC at 100 mg/kg effectively induced mRNA expression for IL-10 ($p < 0.0001$) and TGF- β ($p < 0.001$) compared to both the vehicle and nimesulide groups. This finding underscores the protective effect of 7HC in the animal model of periodontal disease induced by LPS (Figure 2).

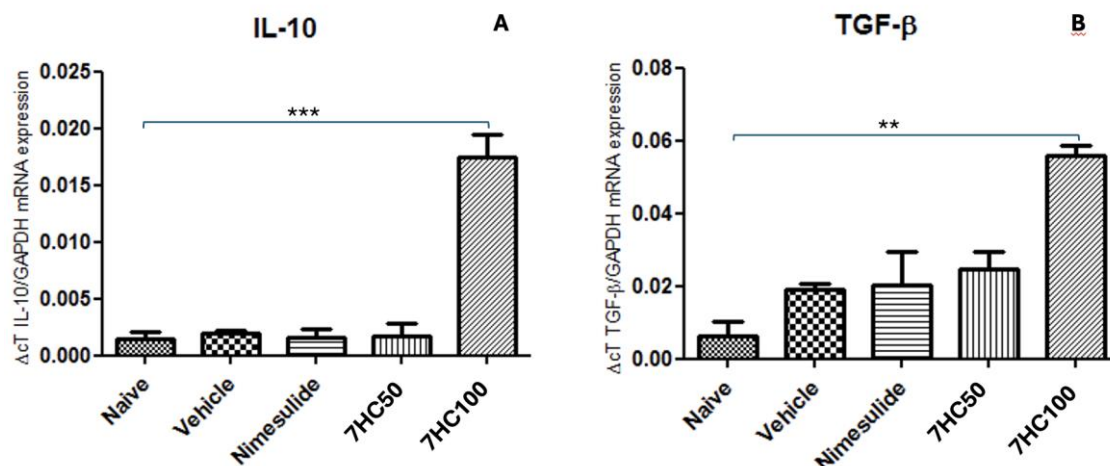


Figure 2. Impact of 7-hydroxycoumarin (7HC) treatment at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg on the mRNA expression of anti-inflammatory (A, B) cytokines in gingival tissue excised from C57BL/6 mice with experimental periodontal disease. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance is indicated at $p < 0.001^{**}$; $p < 0.0001^{***}$.

IL-10 is crucial for regulating the inflammatory response in periodontal disease, as it reduces inflammation and helps prevent excessive tissue damage [39]. Meanwhile, TGF- β promotes tissue healing in areas affected by periodontal disease by stimulating the production of extracellular matrix components, such as collagen. It also enhances the synthesis of proteinase inhibitors and inhibits the production of collagenases [40].

TGF- β facilitates the migration and differentiation of osteoblast precursors [41], thereby stimulating the production of bone matrix. Moreover, it induces B lymphocytes to differentiate into plasma cells that produce IgA [42]. IgA is essential for protecting mucous membranes, which is particularly pertinent in periodontal therapy.

Studies have documented the effects of coumarins on osteoclasts. For instance, urolithin b suppresses osteoclast activation and reduces bone loss of osteoporosis [43]. Furthermore, the *in vitro* effects of *Cnidium monnieri* extract, comprised 80% coumarins, successfully inhibited the differentiation of osteoclast precursors into active osteoclasts [44].

In line with this idea, to assess whether 7HC effectively controlled the progression of bone resorption, the distance between the cemento-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC) was measured. The results demonstrated that the distance between the CEJ and ABC in animals treated with

the vehicle was significantly greater than that observed in the naïve group ($p < 0.05$). Although treatment with 7HC at 50 mg/kg and 100 mg/kg did not stop bone resorption progression, it suggests a protective effect. This conclusion is reinforced by the fact that the distance between the CEJ and ABC in the treated animals did not differ statistically from that of the naïve group (Figure 3).

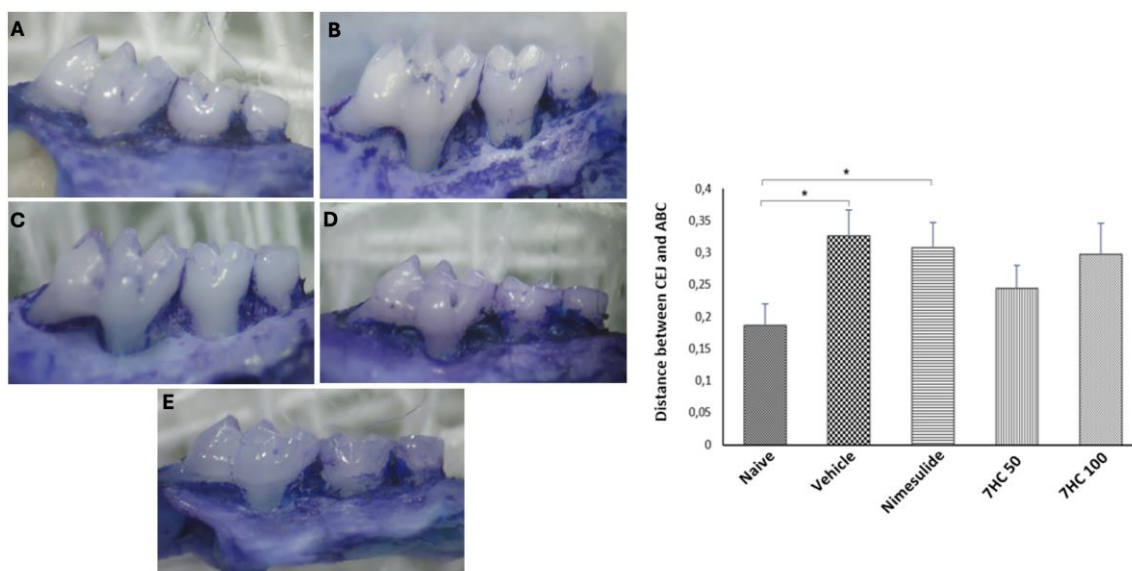


Figure 3: The impact of the compound 7-hydroxycoumarin (7HC) on alveolar bone resorption in the maxilla of C57BL/6 mice with induced periodontal disease. Panels A to E showcase representative images from various treatment groups: (A) Naïve, (B) Vehicle, (C) Nimesulide, (D) 7HC at 50 mg/kg, and (E) 7HC at 100 mg/kg. The graph compares bone resorption caused by lipopolysaccharide (LPS), with that treated by 7-hydroxycoumarin (7HC). The following key terms are defined: CEJ - Cementoenamel junction; ABC - Alveolar bone crest. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation, with statistical significance denoted as * $p < 0.05$.

The protective effect against bone resorption can be attributed to the anti-inflammatory properties of 7HC. Specifically, interleukin-6 can stimulate the expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in osteoblasts and osteocytes [45]. RANKL is a crucial signaling molecule that belongs to the tumor necrosis factor superfamily and is secreted by various cell types, including osteoblasts, bone marrow stromal cells [46], and lymphocytes [47]. Once released, RANKL binds to the RANK receptor located on the surface of osteoclast precursors. This interaction is important for promoting the differentiation of these precursors into mature osteoclasts, the specialized cells responsible for bone resorption [48]. Thus, IL-6 also contributes to inflammatory

processes and plays a pivotal role in bone remodeling through its influence on RANKL and osteoclast biology.

The alveolar bone resorption process is influenced by matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), an enzyme that serves as an important indicator of periodontal disease progression. MMP-9 degrades collagen types IV, V, and XI, along with proteoglycans and elastin, thus playing a critical role in tissue destruction [49].

In this context, the role of MMP-9 in the animal model of LPS-induced periodontal disease was investigated using excised gingival tissue, which was analyzed to determine the expression of mRNA for the metalloproteinase-9. The findings revealed that animals treated with the vehicle exhibited a significantly higher expression of mRNA for MMP-9 compared to those treated with 7HC at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg, nimesulide at 25 mg/kg, and the naïve group ($p < 0.0001$). Notably, the results for the 7HC-treated groups were not statistically different to those of the standard drug, suggesting that 7HC possesses bioactive properties that may be beneficial in developing treatments for periodontal disease (Figure 4). This finding may elucidate the observed protective effect on bone resorption induced by 7HC, presented in this study.

An interesting observation was the reduced expression of TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinases) in mice treated with 7HC (Figure 5). TIMP is essential for remodeling the extracellular matrix, as it regulates the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) [50]. Consequently, it was expected that the treatment would increase in the expression of this protective biomarker. However, the highest levels of TIMP-1 mRNA expression were found in the group of animals receiving the vehicle control, in comparison to those treated with nimesulide at 25 mg/kg, 7HC at both 50 mg/kg ($p < 0.001$) and 100 mg/kg ($p < 0.0001$). Given that 7HC inhibits MMP-9, it can be inferred that there was no stimulation of TIMP expression in this scenario.

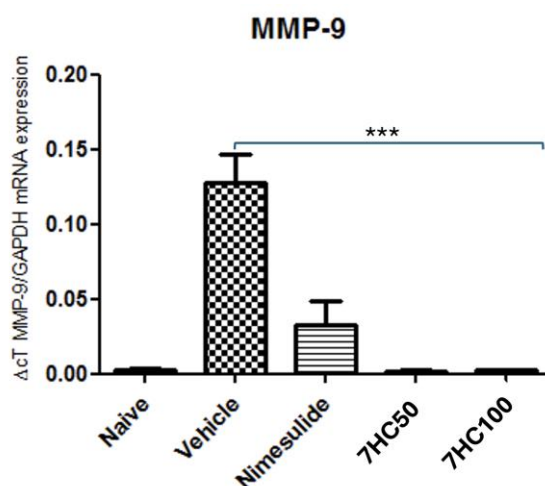


Figure 4. Impact of 7-hydroxycoumarin (7HC) treatment at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg on the mRNA expression of matrix metalloproteinases-9 in gingival tissue excised from C57BL/6 mice with experimental periodontal disease. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance is indicated at $p < 0.0001^{***}$.

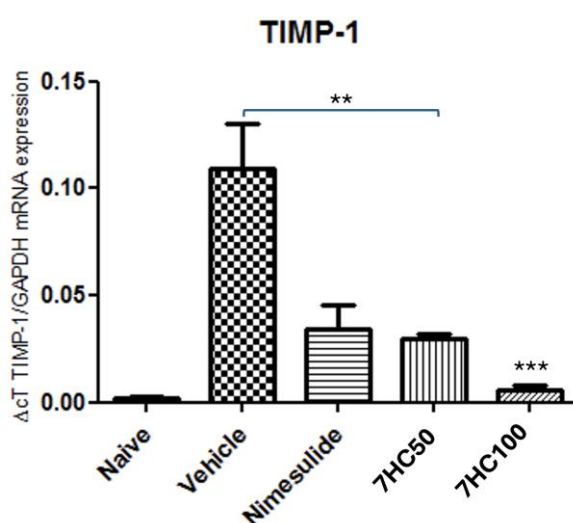


Figure 5. Impact of 7-hydroxycoumarin (7HC) treatment at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg on the mRNA expression of TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) in gingival tissue excised from C57BL/6 mice with experimental periodontal disease. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. Statistical significance is indicated at $p < 0.001^{**}$; $p < 0.0001^{***}$.

The study demonstrated that 7HC has significant anti-inflammatory effects by inhibiting the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6. Additionally, it reduces the expression of matrix metalloproteinase MMP-9, which is involved in tissue degradation characteristic of periodontitis. At the same time, 7HC increases the expression of mRNA for IL-10 and TGF- β , both of which are

cytokines with anti-inflammatory and regenerative roles. This suggests that 7HC may act as an anti-inflammatory bioactive. These findings highlight the potential of 7HC as an adjuvant therapeutic agent in treating periodontal disease, aiding in inflammation control and the preservation of periodontal tissues. Its applications in dentistry could range from mouthwashes to targeted delivery systems in periodontal pockets.

It is essential to recognize that 7-hydroxycoumarin may exhibit toxicity at higher doses. A study involving mice revealed that 7-hydroxycoumarin is not toxic at doses up to 200 mg/kg [51]. However, research by Galliccio et al.[52] showed that it inhibits human bone marrow stem cells only at concentrations exceeding 200 µg/mL, suggesting potential toxicity at elevated doses.

In terms of absorption and bioavailability, a Caco-2 cell model demonstrated significant absorption through passive diffusion, with a recovery rate of approximately $83.31 \pm 3.52\%$. Additionally, Ritschel et al. [53] investigated the bioavailability of umbelliferone in rhesus monkeys at a dose of 1 mg/kg, reporting a half-life of 0.8 ± 0.29 hours following intravenous administration, along with a low oral bioavailability of only $17.0 \pm 5\%$.

The study has important limitations, such as the use of an animal model, which complicates the direct extrapolation of results to humans. Furthermore, it lacked assessments of possible systemic side effects and controlled clinical trials. Therefore, additional human studies are essential to validate its safety and clinical efficacy.

4 Conclusions

Effectively managing the inflammatory immune response in periodontal disease is essential for evaluating treatment outcomes and prognosis. In this study, researchers explored the effects of the compound 7HC in an animal model of LPS-induced periodontal disease. The results revealed that 7HC inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines while promoting a shift in the cytokine balance toward a predominance of anti-inflammatory cytokines. Additionally, it reduced the expression of matrix metalloproteinase MMP-9, which is linked to the tissue degradation associated with periodontitis. This dual mechanism provided protective effects against alveolar bone resorption. These encouraging findings

suggest that 7HC could serve as a valuable bioactive agent for enhancing periodontal therapy, offering hope for improved management of periodontal disease.

Data Availability

The data supporting the findings of this study may be obtained from the corresponding author upon a reasonable request.

Conflicts of interest

The authors hereby declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Funding statement

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) [INCT RENNOFITO 465536/2014–0], by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia [BioproFAR-BA PIE0001/2024]; and was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) [finance code 001].

References

1. R. P. Darveau, A. Tanner, R. C. Page. "The Microbial Challenge in Periodontitis." *Periodontology* 2000 14, no. 1 (1997): 12–32, doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00190.x.
2. G. Hajishengallis, and J. D. Lambris. "Complement and Dysbiosis in Periodontal Disease." *Immunobiology* 217 (2012): 111-1116, doi:10.1016/j.imbio.2012.07.007.
3. M.Turkmen, and E. Firatli. "The Study of Genetic Predisposition on Periodontitis and Peri-Implantitis," *Nigerian Journal of Clinical Practice* 25, no. 11 (2022): 1799–1804, https://doi:10.4103/njcp.njcp_19_22.
4. D. T. Graves, T. Oates, and G.P. Garlet. "Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions," *Journal of Oral Microbiology* 3 (2011), doi:10.3402/jom.v3i0.5304.

5. J.S. Becerra-Ruiz, C. Guerrero-Velázquez; F. Martínez-Esquivias; L.A. Martínez-Pérez; J.M. Guzmán-Flores. "Innate and Adaptive Immunity of Periodontal Disease: From Etiology to Alveolar Bone Loss," *Oral Diseases* 28, no. 6 (2022): 1441–1447. [http:// doi:10.1111/odi.13884](http://doi:10.1111/odi.13884).
6. D. Liccardo, A. Cannavo; G. Spagnuolo,; N. Ferrara; A. Cittadini; C. Rengo; G. Rengo. "Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease," *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 6 (2019), doi:10.3390/ijms20061414.
7. P. Tsikouras, E. Oikonomou, K. Nikolettos, S. Andreou, D. Kyriakou, C. Damaskos, N. Garmpis, V. Monastiridou, T. Nalmpanti, A. Bothou; G. Iatrakis; N. Nikolettos. "The Impact of Periodontal Disease on Preterm Birth and Preeclampsia," *Journal of Personalized Medicine* 14 (2024): 345. <https://doi:10.3390/jpm14040345>.
8. R.P. Murphy, G.J. Hankey; C. Judge; C. Reddin; P. Langhorne; P. López-Jaramillo; C. Mondo; D. Xavier; X. Wang; S. Yusuf; M. O'Donnell, M. "Markers of Periodontal Disease and Risk of Stroke: INTERSTROKE Case-Control Study," *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association* 33, no. 8 (2024): 107803. <https://doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2024.107803>.
9. K. Matsushita, M. Yamada-Furukawa; M. Kurosawa; Y. Shikama. "Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease," *Journal of Inflammation Research* 13 (2020): 275-283, doi:10.2147/JIR.S255309.
10. Z.L.S. Brookes, R. Bescos, L. A. Belfield, K. Ali, and A. Roberts. "Current Uses of Chlorhexidine for Management of Oral Disease: A Narrative Review," *Journal of Dentistry* 103 (2020): 103497, doi:10.1016/j.jdent.2020.103497.
11. P. James, H.V. Worthington, C. Parnell, M. Harding; T. Lamont; A. Cheung; H. Whelton, P. Riley. "Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health," *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017(3), [http// doi:10.1002/14651858.CD008676.pub2](http://doi:10.1002/14651858.CD008676.pub2).
12. Z. Brookes, L. Teoh; F. Cieplik; P. Kumar. "Mouthwash Effects on the Oral Microbiome: Are They Good, Bad, or Balanced?" *International Dental Journal* 73, Suppl 2 (2023): S74–S81, doi:10.1016/j.identj.2023.08.010.

13. Y. Zhu, C. Tao; C. Goh; A. Shrestha. "Innovative Biomaterials for the Treatment of Periodontal Disease," *Frontiers in Dental Medicine* 4 (2023), doi:10.3389/fdmed.2023.1163562.
14. R. A. Milutinovici, D. Chioran; R. Buzatu; I. Macasoi; S. Razvan; R. Chioibas; I.V. Corlan; A. Tanase; C. Horia; R.A. Popovici; S. Dinu; C. Dehelean; A. Scurtu; I. Pizaru; C. Soica. "Vegetal Compounds as Sources of Prophylactic and Therapeutic Agents in Dentistry," *Plants* 10, no. 10 (2021), doi:10.3390/plants10102148.
15. A. Gościński, M. Paczkowska-Walendowska, A. Skotnicka, M.A. Ruchała & J. Cielecka-Piontek. "Can Plant Materials Be Valuable in the Treatment of Periodontal Diseases? Practical Review," *Pharmaceutics* 13, no. 12 (2021): 2185. doi:10.3390/pharmaceutics13122185.
16. G. Kanimozhi, N.R. Prasad, S. Ramachandran, and K.V. Pugalendi. "Umbelliferone Modulates Gamma-Radiation Induced Reactive Oxygen Species Generation and Subsequent Oxidative Damage in Human Blood Lymphocytes," *European Journal of Pharmacology* 672, no. 1-3 (2011): 20-29, doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.003.
17. A.K. Singh, P.K. Patel, K. Choudhary, J. Joshi, D. Yadav, J.O. Jin. "Quercetin and Coumarin Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV and Exhibits Antioxidant Properties: In Silico, In Vitro, Ex Vivo," *Biomolecules* 10, no. 2 (2020): 207. doi:10.3390/biom10020207. PMID: 32023875; PMCID: PMC7072504.
18. L.C. Di Stasi. "Coumarin Derivatives in Inflammatory Bowel Disease," *Molecules* 26, no. 2 (2021): 422. doi:10.3390/molecules26020422. PMID: 33467396; PMCID: PMC7830946.
19. V. Soares, M. B. Marini, L. A. de Paula, P. S. Gabry, A. C. F. Amaral, C. A. Malafaia, I.C.R. Leal. "Umbelliferone Esters with Antibacterial Activity Produced by Lipase-Mediated Biocatalytic Pathway, " *Biotechnology Letters* 43, no. 2 (2020): 469-477, doi:10.1007/s10529-020-03014-9.
20. A. Marquis, S. Genovese, F. Epifano, and D. Grenier. "The Plant Coumarins Auraptene and Lacinartin as Potential Multifunctional Therapeutic Agents for Treating Periodontal Disease," *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12 (2012): 80. doi:10.1186/1472-6882-12-80.
21. L. Ji-ye, L. Jim-Hyun, L. Dong-Hyun, L. Jeong-Heon, and K. Dea-Ki. "Umbelliferone Reduces the Expression of Inflammatory Chemokines in

- HaCaT Cells and DNCB/DFE-Induced Atopic Dermatitis Symptoms in Mice," *International Immunopharmacology* 75 (2019): 105830, doi:10.1016/j.intimp.2019.105830.
22. Y. Zheng, and L. Lakshmanan. "Dose-Dependent Efficacy of Umbelliferone and Gelatin-Coated ZnO/ZnS Core-Shell Nanoparticles: A Novel Arthritis Agent for Severe Knee Arthritis," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022 (2022): 7795602. doi:10.1155/2022/7795602.
 23. O. Mazimba. "Umbelliferone: Sources, Chemistry and Bioactivities Review," *Bulletin of the Faculty of Pharmacy, Cairo University* 55 (2017): 223–232, doi:10.1016/j.bfopcu.2017.05.001.
 24. Y. Huang, W. Li, Z. Su, and A. T. Kong. "The Complexity of the Nrf2 Pathway: Beyond the Antioxidant Response," *Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (2015): 1401–1413, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.
 25. M. O. Sim, H. I. Lee, J. R. Ham, K. I. Seo, M. J. Kim, and M. K. Lee. "Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Umbelliferone in Chronic Alcohol-Fed Rats." *Nutritional Research and Practice* 9, no. 4 (2015): 364-369, doi:10.4162/nrp.2015.9.4.364.
 26. J. H. Lee, Y. G. Kim, H. S. Cho, S. Y. Ryu, M. H. Cho, and J. Lee. "Coumarins Reduce Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7." *Phytomedicine* 21 (2014): 1037-1042, doi:10.1016/j.phymed.2014.04.008.
 27. K. T. Swetha, M. Pooranachthra, G. A. Subramenium, V. Divya, K. Balamurugan, and S. K. Pandian. "Umbelliferone Impedes Biofilm Formation and Virulence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* via Impairment of Initial Attachment and Intercellular Adhesion." *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 9 (2019): 357, doi:10.3389/fcimb.2019.00357.
 28. F.O. de Lima; F.R. Nonato; R.D. Couto; J.M. Barbosa Filho; X.P. Nunes; R.R. dos Santos; M.B.P. Soares; C.F. Villarreal, "Mechanisms Involved in the Antinociceptive Effects of 7-Hydroxycoumarin," *Journal of Natural Products* 74, no. 4 (2011): 596–602, doi:10.1021/np100621c.
 29. J. Trombetta-Silva, M. C. Figueiredo, A. R. Silva, L. C. Simionato, and M. R. Garlet. "LPS Induces Greater Bone and PDL Loss in SPARC-Null Mice," *Journal of Dental Research* 90, no. 4 (2011): 477–482.
 30. M. B. Kasapoglu, and A. T. Cebi. "Randomized Split-Mouth Study for Evaluating the Efficacy of Nimesulide and Nimesulide + Thiocolchicoside

- Combination Following Impacted Mandibular Third Molar Surgery," *Nigerian Journal of Clinical Practice* 25, no. 5 (May 2022): 641–646, https://doi:10.4103/njcp.njcp_1623_21.
31. K. B. Gama, D. S. Santos, A. F. Evangelista, D. N. Silva, A. C. de Alcântara, R. R. Dos Santos, M. B. P. Soares, e C. F. Villarreal. "Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation," *Stem Cells International* 2018 (2018): 8179013, doi:10.1155/2018/8179013.
 32. A. F. Evangelista, M. A. Vannier-Santos, G. S. de Assis Silva, D. N. Silva, P. J. L. Juiz, C. K. V. Nonaka, R. R. Dos Santos, M. B. P. Soares, e C. F. Villarreal. "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Reverse the Sensorial Diabetic Neuropathy via Modulation of Spinal Neuroinflammatory Cascades," *Journal of Neuroinflammation* 15, no. 1 (2018): 189, doi:10.1186/s12974-018-1224-3.
 33. de Souza, J. A. C., A. V. B. Nogueira, P. P. C. de Souza, J. A. Cirelli, G. P. Garlet, e C. Rossa Jr. "Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 1 and 3 in Ligature-Induced Periodontitis in Rats," *Archives of Oral Biology* 56 (2011): 1120–1128. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.022>.
 34. C. A. Dinarello. "Overview of the IL-1 Family in Innate Inflammation and Acquired Immunity," *Immunological Reviews* 281, no. 1 (2018): 8–27, doi:10.1111/imr.12621.
 35. P. J. Godowski. "A Smooth Operator for LPS Responses," *Nature Immunology* 6, no. 6 (2005): 544–546, doi:10.1038/ni0605-544.
 36. A. F. Stadler, P. D. Angst, R. M. Arce, S. C. Gomes, R. V. Oppermann, and C. Susin. "Gingival Crevicular Fluid Levels of Cytokines/Chemokines in Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis," *Journal of Clinical Periodontology* 43 (2016): 727–745. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12557>.
 37. Z. P. Keles Yucel, G. C. Keles, B. Avci, and B. O. Cetinkaya. "Nonsurgical Periodontal Therapy Reduces Salivary and Gingival Crevicular Fluid YKL-40 and IL-6 Levels in Chronic Periodontitis," *Oral Health & Preventive Dentistry* 18 (2020): 815–822. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a45086>.
 38. M. Relvas, A. Mendes-Frias, M. Gonçalves, F. Salazar, P. López-Jarana, R. Silvestre, and A. Viana da Costa. "Salivary IL-1 β , IL-6, and IL-10 Are Key

- Biomarkers of Periodontitis Severity,” *International Journal of Molecular Sciences* 25 (2024): 8401. <https://doi.org/10.3390/ijms25158401>.
39. R. A. Saxton; N. Tsutsumi; L.L. Su; G.C. Abhiraman; K. Mohan; L.T. Henneberg; N.G. Aduri; C. Gati; K.C. Garcia. “Structure-Based Decoupling of the Pro- and Anti-Inflammatory Functions of Interleukin-10,” *Science* 371, no. 6535 (2021), doi:10.1126/science.abc8433.
 40. R. D. A. U. Lins; K.C.R. Lucena; R.C.Q. Ferreira; É.J.D. da Silveira; L.P. Pinto; R.C.B. Gomes. “The Cytokines and the Periodontium: The Role of Growth Factors in Periodontal Health,” *International Journal of Dentistry* 9, no. 1 (2010): 38–43.
 41. K. Takeyama, M. Chatani, K. Inohaya, and A. Kudo. “TGF β -2 Signaling Is Essential for Osteoblast Migration and Differentiation during Fracture Healing in Medaka Fish,” *Bone* 86 (May 2016): 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.001>.
 42. J. Stavnezer, J. E. Guikema, and C. E. Schrader. “Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination,” *Annual Review of Immunology* 26 (2008): 261–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>.
 43. Y. Li, Q. Zhuang, L. Tao; K. Zheng; S. Chen; Y. Yang; C. Feng; Z. Wang; H. Shi; J. Shi; Y. Fang; L. Xiao; D. Geng; Z. Wang. “Urolithin B Suppressed Osteoclast Activation and Reduced Bone Loss of Osteoporosis via Inhibiting ERK/NF- κ B Pathway,” *Cell Proliferation* 55, no. 10 (2022): e13291. <https://doi.org/10.1111/cpr.13291>.
 44. L. P. Qin, Q. Y. Zhang, Y. P. Tian, H. C. Zheng, M. Huang, and B. K. Huang. “Total Coumarins from Fruits of *Cnidium monnieri* Inhibit Formation and Differentiation of Multinucleated Osteoclasts of Rats,” *Acta Pharmacologica Sinica* 24, no. 2 (2003): 181–186.
 45. H. J. Kim, H. J. Kim, Y. Choi, M. K. Bae, D. S. Hwang, S. H. Shin, and J. Y. Lee. “Zoledronate Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclast Differentiation by IL-6/RANKL Axis,” *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 6 (2019): 1467. <https://doi.org/10.3390/ijms20061467>.
 46. T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie, and T. J. Martin. “Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand

- Families," *Endocrine Reviews* 20 (1999): 345–357, doi:10.1210/edrv.20.3.0367.
47. Y. Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe; T. Wong; G. Campagnuolo; E. Moran; E.R. Bogoch; G. Van; L.T. Nguyen; P.S. Ohashi; D.L. Lacey; E. Fish; W. J. Boyle; J. M. Penninger. "Activated T Cells Regulate Bone Loss and Joint Destruction in Adjuvant Arthritis through Osteoprotegerin Ligand," *Nature* 402 (1999): 304–309, doi:10.1038/46303.
 48. H. Kitaura, A. Marahleh, F. Otori, T. Noguchi, W. R. Shen, J. Qi, Y. Nara, A. Pramusita, R. Kinjo, and I. Mizoguchi. "Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption," *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 14 (2020): 5169. <https://doi.org/10.3390/ijms21145169>.
 49. M. M. Bildt, M. Bloemen, A. M. Kuijpers-Jagtman, and J. W. Von den Hoff. "Collagenolytic Fragments and Active Gelatinase Complexes in Periodontitis," *Journal of Periodontology* 79 (2008): 1704–1711, doi:10.1902/jop.2008.080021.
 50. C. Ries. "Cytokine Functions of TIMP-1," *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, no. 4 (2013): 659–672, doi:10.1007/s00018-013-1457-3.
 51. L. F. Cruz, G. F. De Figueiredo, L. P. Pedro, Y. M. Amorin, J. T. Andrade, T. F. Passos, F. F. Rodrigues, I. L. A. Souza, T. P. R. Goncalves, L. Lima, J. M. S. Ferreira, and M. G. D. Araujo. 2020. "Umbelliferone (7-Hydroxycoumarin): A Non-Toxic Antidiarrheal and Antiulcerogenic Coumarin." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 129: 110432, doi:10.1016/j.biopha.2020.110432.
 52. V. S. Gallicchio, B. C. Hulette, C. Harmon, and M. E. Marshall. 1989. "Toxicity of Coumarin (1,2-Benzopyrone) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Human and Murine Bone Marrow Progenitor Stem Cells." *Journal of Biological Response Modifiers* 8: 116–121.
 53. W. A. Ritschel, D. D. Denson, and K. W. Grummich. 1988. "Pharmacokinetics of Coumarin and 7-Hydroxycoumarin in the Rhesus Monkey After Intravenous and Peroral Administration." *Arzneimittelforschung* 38: 1619–1623.

CAPÍTULO III

**Perda de nível ósseo alveolar induzida por
lipopolissacarídeo: um estudo comparativo entre as
linhagens de camundongo Swiss e C57BL/6**

Perda de nível ósseo alveolar induzida por lipopolissacarídeo: um estudo comparativo entre as linhagens de camundongo Swiss e C57BL/6

RESUMO

Introdução: A doença periodontal tem etiologia multifatorial, onde a resposta imune ao desafio microbiano resulta em inflamação dos tecidos gengivais, ativação de osteoclastos e reabsorção do osso alveolar, culminando com a perda do elemento dental, portanto compreender o processo de reabsorção óssea é um importante passo em pesquisas que visam compreender a fisiopatologia da doença, e neste sentido os modelos animais de doença periodontal são ferramentas úteis.

Objetivo: Comparar a perda de nível ósseo alveolar, em modelo animal de doença periodontal induzida (PI) por lipopolissacarídeo (LPS), entre duas linhagens de camundongos, a Swiss e a C57BL/6. **Metodologia:** Os camundongos de cada linhagem foram reunidos em grupos visando avaliar a progressão da perda de nível ósseo alveolar no 7º, 14º, 21º e 28º dias de indução da PI por meio da administração, na papila gengival localizada entre o primeiro e segundo molar superior esquerdo, de 20 µg/µL de LPS de *Escherichia coli* diluído em água de injeção. Ao final de cada período do experimento, os animais foram eutanasiados e amostras do tecido gengival e do tecido ósseo (maxila) foram excisados para avaliação histológica e morfométrica, respectivamente. **Resultados:** A avaliação histológica, em ambas as linhagens, evidenciou um infiltrado inflamatório a partir de 7 dias de indução, o qual se torna mais acentuado a partir de 14 dias. Na linhagem Swiss, a perda de nível ósseo alveolar inicia aos 7 dias de indução e evolui de maneira agressiva, apresentando lesão de furca pronunciada a partir do 21º dia. Enquanto na linhagem C57BL/6, a perda óssea é vista a partir do 14º dia e a progressão da doença ocorre de maneira mais sutil. **Conclusão:** A depender do objetivo da pesquisa, usar a linhagem Swiss é mais viável por otimizar tempo e custo operacional, já que 21 dias são suficientes para demonstrar a progressão da doença periodontal, enquanto que para linhagem C57BL/6 são necessários 28 dias.

Palavras-chave: Modelo animal, doença periodontal, inflamação, perda de nível ósseo, LPS.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal disease is characterized by a multifactorial etiology, wherein the immune response to microbial challenges initiates inflammation of the gingival tissues. This inflammatory process leads to the activation of osteoclasts and subsequent resorption of alveolar bone, ultimately resulting in the loss of the affected dental elements. Understanding the process of bone resorption is crucial for research into the pathophysiology of the disease; therefore, animal models of periodontal disease serve as valuable tools. **Objective:** To compare the loss of alveolar bone levels in an animal model of periodontal disease induced by lipopolysaccharide (LPS) between two strains of mice: Swiss and C57BL/6. **Methodology:** Mice from each lineage were grouped to assess the progression of alveolar bone loss on the 7th, 14th, 21st, and 28th days after intraperitoneal (IP) induction. This was achieved by administering 20 µg/µL of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), diluted in injection water, to the gingival papilla situated between the first and second upper left molars.

At the conclusion of each experimental period, the animals were euthanized, and samples of gingival and maxillary bone tissues were excised for histological and morphometric evaluations, respectively. Both strains displayed an inflammatory infiltrate during histological evaluation, which was evident from 7 days of induction and became more pronounced after 14 days. In the Swiss strain, alveolar bone loss began on the seventh day of induction and progressed rapidly, showing a significant furcation lesion from the 21st day onwards. In the C57BL/6 strain, bone loss was observed starting from the 14th day, and the progression of the disease was more subtle. **Conclusion:** Depending on the research objectives, using the Swiss strain is more advantageous because it reduces both time and operational costs. The Swiss strain can demonstrate the progression of periodontal disease in just 21 days, while the C57BL/6 strain requires 28 days for similar results.

Keywords: Animal model, periodontitis, mice, inflammation, bone resorption, LPS.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma enfermidade crônica, de etiologia multifatorial, cuja resposta imune frente ao biofilme subgengival disbiótico, resulta em ativação de osteoclastos e reabsorção óssea, podendo levar à perda do dente (BECERRA-RUIZ *et al*, 2022). Portanto, entender o processo de reabsorção óssea alveolar é fundamental para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas, neste sentido, o uso de modelos animais pode ser satisfatório.

O uso da experimentação animal em diferentes áreas do conhecimento vem contribuindo com a descoberta de abordagens terapêuticas e preventivas para inúmeras doenças (CHORILLI *et al*, 2007).

De acordo com a Resolução normativa brasileira do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) nº 25, de 29 de setembro de 2015, um modelo animal deve ser definido pelos objetivos do projeto e relevância do sistema biológico que se pretende estudar, de modo a selecionar a melhor linhagem de animal, independente da conveniência ou orçamento.

Na periodontologia, a complexa resposta imune do hospedeiro ao processo infeccioso, que em primeira instância é a responsável pela reabsorção óssea e perda do dente, não pode ser reproduzida *in vitro*, de modo que os modelos animais são úteis neste tipo de estudo (KANTARCI *et al*, 2015), embora a experimentação com animais não reproduza de forma fidedigna a doença humana (HAJISHENGALLIS, 2023).

Entre o reino animal, roedores, coelhos, porcos, cães e primatas não humanos têm sido usados para modelar a doença periodontal humana, cada um com vantagens

e desvantagens (OZ e PULEO, 2011; BRITO *et al*, 2021). A similaridade entre os tecidos periodontais de roedores e humanos, principalmente na região dos molares, faz com que esses animais sejam usados em modelos para pesquisa científica, que visam analisar a perda óssea alveolar e processos inflamatórios (VERÍSSIMO, 2022).

Entretanto, a presença de uma microbiota bucal diferente e a resistência natural ao desenvolvimento da doença periodontal podem ser um obstáculo. Além disso, os animais são de pequeno porte, e, portanto, a quantidade de tecido disponível para análise é menor, o que necessita muitos animais para o experimento (OZ e PULEO, 2011).

Os modelos de doença periodontal mais comuns envolvem: a) a introdução de cepas bacterianas humanas por gavagem oral; b) o uso de ligaduras com fio de seda amarrado em torno dos dentes, induzindo um acúmulo de biofilme dental pela introdução de bactérias no sulco gengival e; 3) injeção de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano purificado no tecido gengival que circunda os dentes posteriores (CARVALHO, 2020).

Para este trabalho, foi adotada a opção de número “3”. A escolha deste método foi relacionada a sua praticidade e possibilidade de controlar as doses administradas, além do conhecimento prévio de que o LPS é uma endotoxina bacteriana altamente imunogênica, além de não necessitar do cultivo de microrganismos anaeróbios, que exigem meios de cultura específicos e anaerobiose para crescimento. Quanto ao método de ligadura, considerando o tamanho dos animais (camundongos), é um método mais trabalhoso, o que foge do escopo do presente trabalho, que propõe aliar eficácia à simplicidade de execução do método.

O LPS, um padrão molecular associado a patógenos (PAMPs), é reconhecido pelo Toll-like receptor (TLR) presente em células da imunidade inata. Essa interação, resulta na transdução de sinal intracelular e ativação de fatores de transcrição para produção de citocinas pró-inflamatórias (DUAN *et al*, 2022). Portanto, quando injetado nos tecidos periodontais desencadeia uma resposta inflamatória, podendo induzir reabsorção óssea.

A ativação do sistema imune na doença periodontal tem um papel importante na diferenciação e ativação de osteoclastos. As citocinas pró-inflamatórias produzidas nesta ativação, modulam a expressão do receptor ativador de ligante do fator nuclear Kappa B (RANKL), uma proteína presente em osteoblastos, fibroblastos e linfócitos. Quando o RANKL se liga ao seu receptor RANK, presente na superfície dos

precursores de osteoclastos, ocorre a ativação e diferenciação desses precursores em osteoclastos maduros. Essa ativação induz a reabsorção óssea. Por outro lado, a interação entre osteoprotegerina (OPG) e RANKL, inibe a ativação de osteoclastos. Em condições normais, um equilíbrio entre RANKL e OPG é essencial para manter a homeostase no ambiente periodontal. No entanto, com a progressão da doença periodontal, ocorre um aumento significativo na expressão de RANKL em comparação com OPG, tendo como consequência a reabsorção óssea alveolar (NEURATH; KESTING, 2024).

Diante do que foi exposto, o presente estudo objetivou comparar, entre as linhagens de camundongos Swiss e C57BL/6, a reabsorção óssea alveolar em modelo animal de doença periodontal induzida por LPS, o que poderá contribuir com os estudos de experimentação animal na doença periodontal, permitindo que pesquisas futuras utilizem a linhagem mais adequada, minimizando o uso excessivo de animais e o sofrimento que o experimento poderá trazer, bem como reduzindo custos relacionados a pesquisa e garantindo uma melhor qualidade dos resultados.

2 METODOLOGIA

Os ensaios com animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, sob número de registro 012/2022, de acordo com a resolução brasileira do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre responsabilidade no uso de animais (CONCEA, 2015).

Com o objetivo de estudar o modelo de doença periodontal induzida por LPS, a cinética do modelo foi realizada nas linhagens C57BL/6 e Swiss, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – BA. O peso dos animais variou entre 25 a 30 gramas, com 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental.

A doença periodontal foi induzida com o protocolo de injeção de LPS adaptado de Trombetta e Silva *et al* (2011). Após devidamente anestesiados (anestesia geral com injeção intraperitoneal de cetamina 5 mg/Kg e xilazina 20 mg/Kg), 1 µL de LPS de *Escherichia coli*, na concentração de 20 µg/µL, foi injetado na papila gengival localizada entre o primeiro e segundo molar superior esquerdo em dias alternados.

Os camundongos de cada linhagem foram reunidos em grupos, sendo:

- 1) Grupo naive (n=6): formado por animais que não receberam injeção de LPS no

tecido gengival;

- 2) Grupo 7 dias (n=6): formado por animais que receberam injeção de LPS no tecido gengival localizado no hemiarco esquerdo, em dias alternados, por um período de 7 dias.
- 3) Grupo controle (n=6): formado pelos animais que fazem parte do grupo 7 dias, sendo o tecido gengival coletado, aquele do lado direito (que não recebeu injeção).
- 4) Grupo 14 dias (n=6): formado por animais que receberam injeção de LPS no tecido gengival localizado no hemiarco esquerdo, em dias alternados, por um período de 14 dias.
- 5) Grupo 21 dias (n=6): formado por animais que receberam injeção de LPS no tecido gengival localizado no hemiarco esquerdo, em dias alternados, por um período de 21 dias.
- 6) Grupo 28 dias (n=6): formado por animais que receberam injeção de LPS no tecido gengival localizado no hemiarco esquerdo, em dias alternados, por um período de 28 dias.

Os animais foram eutanasiados nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 dias com associação de cloridrato de xilazina (1 mg.kg^{-1}) e cetamina (15 mg.kg^{-1}) seguida da overdose anestésica de tiopental sódico (50 mg.kg^{-1}) e administração de cloreto de potássio $2,56 \text{ mEq.kg}^{-1}$ ambos por via intravenosa.

O tecido gengival da região entre primeiro e segundo molar superior da hemiarcada esquerda dos camundongos dos grupo naive, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias, foi excisado para avaliação histológica do infiltrado inflamatório por meio de coloração com hematoxilina-eosina.

Com o objetivo de avaliar se, de fato, o grupo naive é um grupo necessário para os estudos de doença periodontal induzida por LPS em camundongos das linhagens Swiss e C57BL/6, o tecido gengival da região entre primeiro e segundo molar superior da hemiarcada direita dos camundongos do grupo 7 dias foi usado como controle.

Para o estudo da perda de nível ósseo alveolar induzida por LPS, as maxilas dos camundongos dos grupos naive, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias foram removidas, fixadas em formol 4%, durante 24 h. Após esse período, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas (direita e esquerda), dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de distinguir o tecido ósseo, do tecido dentário, o qual se cora

com menos intensidade. Mais uma vez, as hemimaxilas do lado direito do grupo com 7 dias de indução, foram utilizadas como controle, com o objetivo de avaliar se, de fato, o grupo naive era um grupo necessário.

Para avaliação da perda de nível ósseo alveolar, as hemiarcadas foram fotografadas e a medida da maior distância entre a junção cimento/esmalte e crista óssea alveolar foi realizada utilizando o software ImageJ (Figura 1).

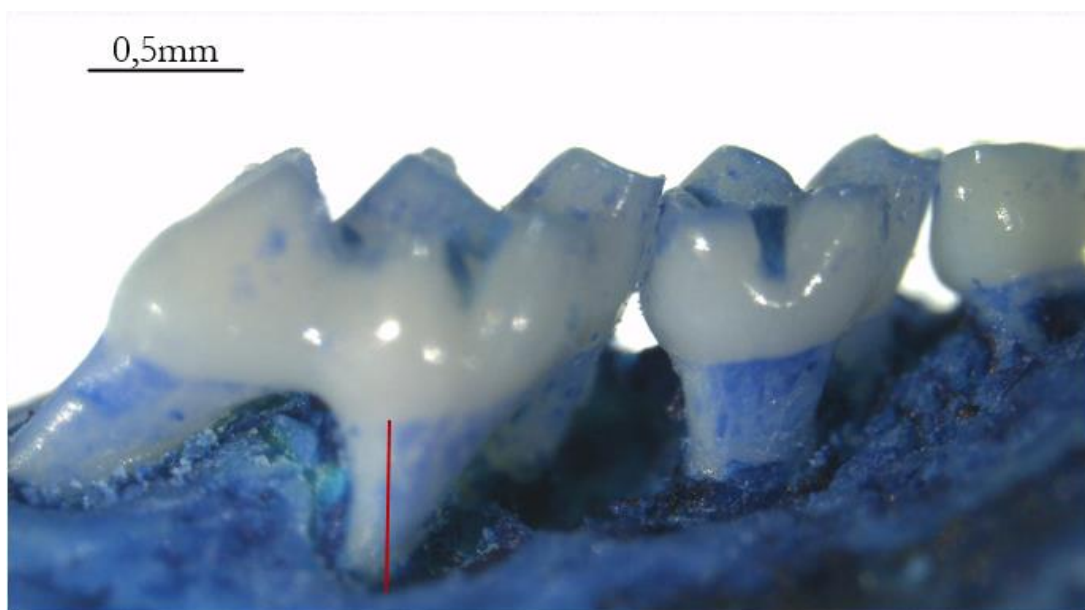


Figura 1: Hemiarcada de um camundongo Swiss, corada com azul de metileno. Linha vermelha indica maior distância entre a junção cimento/esmalte e crista óssea alveolar.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão a partir das análises feitas em grupos de animais. Foi verificada a normalidade dos dados através do teste Kolmogorov-Smirnov. Sendo normais, as comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste one-way ANOVA com pós hoc de Tukey. Quando os dados não foram considerados normais, as comparações entre os grupos foram realizadas através do teste não-paramétrico Friedman com poshoc por pares e comparações por método Pairwise com correção de Bonferroni. Diferenças estatísticas com $p < 0,05$ foram consideradas significantes. A Figura 2 apresenta o fluxograma esquemático do estudo.

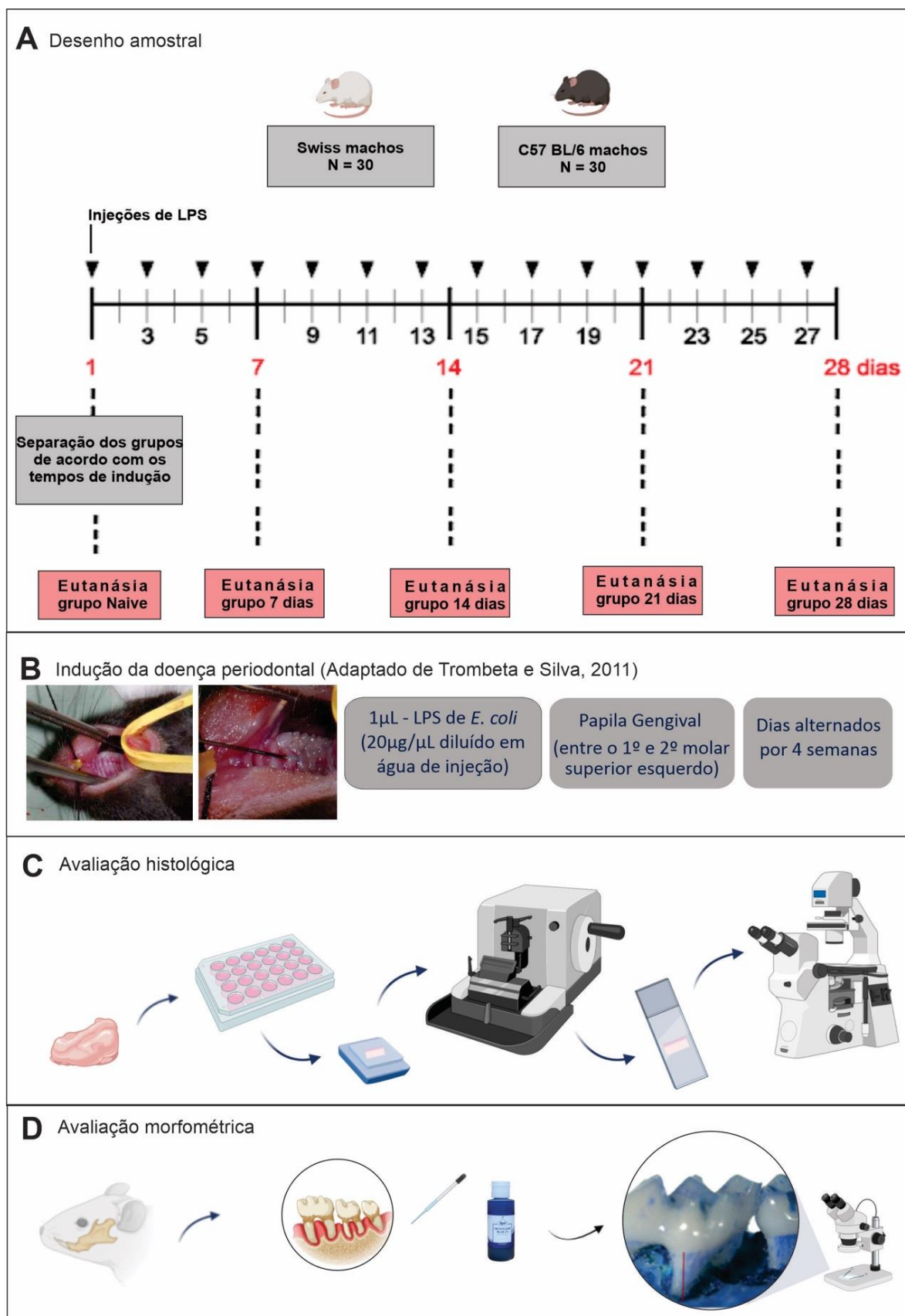


Figura 2: Fluxograma do desenho experimental (A) Desenho amostral composto de 30 camundongos de cada linhagem separados aleatoriamente em 5 grupos: Naive, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias. As setas indicam os dias em que foram realizadas as injeções com LPS. (B) Indução da doença periodontal por meio injeção de 1 μ L de LPS de *Escherichia coli*, na concentração de 20 μ g/ μ L; (C) A avaliação

histológica com coloração de Hematoxilina/Eosina para avaliar o infiltrado inflamatório no tecido gengival; (D) Avaliação morfométrica da maxila utilizando coloração de azul de metileno a 1% para avaliar a perda de nível ósseo alveolar.

3 RESULTADOS

Este trabalho mostrou que injeções de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* em dias alternados foram capazes de induzir a doença periodontal, tanto na linhagem Swiss, como na linhagem C57BL/6.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos para o grupo controle. Os cortes histológicos representam o tecido gengival da região entre o primeiro e segundo molar direito, dos camundongos do grupo 7 dias que receberam injeções de LPS no tecido gengival da região entre o primeiro e segundo molar do lado esquerdo.

Os resultados mostram ausência de infiltrado inflamatório no tecido gengival em ambas as linhagens, bem como ausência de perda de nível ósseo alveolar, achados compatíveis com saúde periodontal.

Os achados evidenciam que, para a avaliação da perda de nível ósseo alveolar em camundongos das linhagens Swiss e C57BL/6, a inclusão de um grupo Naive como controle não se faz necessária. Isso se deve ao fato de que a hemiarcada contralateral àquela submetida à indução por LPS, não apresentou alterações histológicas ou ósseas compatíveis com a presença de doença periodontal.

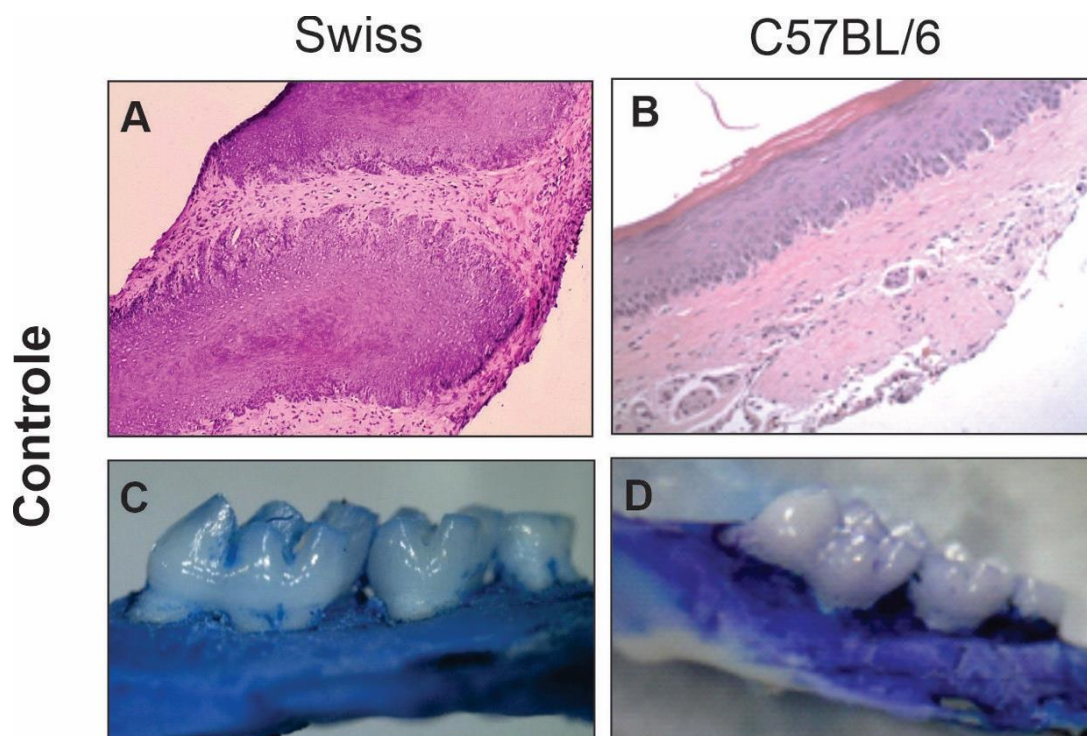


Figura 3- Fotomicrografia (Objetiva 10x) do tecido gengival da região entre molares superiores direito nas linhagens Swiss (A) e C57/BL6 (B) e avaliação morfométrica da perda de nível ósseo alveolar nas linhagens Swiss (C) e C57BL/6 (D) para o grupo controle, após injeção de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 7 dias no tecido gengival correspondente do lado esquerdo.

Após 7 dias de injeções de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), histologicamente é possível notar infiltrado inflamatório perivascular e presença de pequeno infiltrado inflamatório no tecido gengival em ambas as linhagens. No entanto, apenas para a linhagem Swiss foi observado início de perda de nível ósseo alveolar e perda de crista óssea alveolar, compatível com uma periodontite inicial (Figura 4).

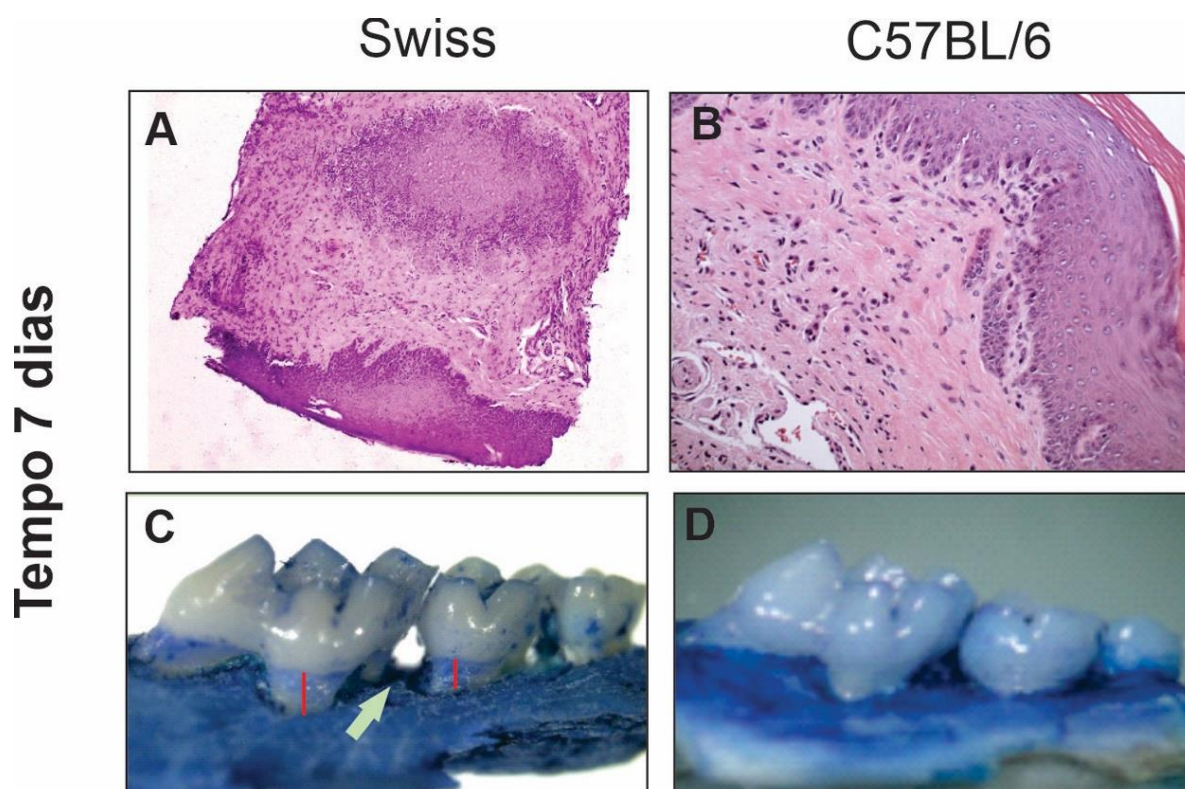


Figura 4- Fotomicrografia (Objetiva 10x) do tecido gengival da região entre molares superiores esquerdo nas linhagens Swiss (A) e C57/BL6 (B) e avaliação morfométrica da perda de nível ósseo alveolar nas linhagens Swiss (C) e C57BL/6 (D) para o grupo 7 dias, após injeção de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 7 dias no tecido gengival. A barra vermelha indica distância entre a crista óssea e junção cimento/esmalte; Seta verde indica Reabsorção de crista óssea alveolar (espaço interproximal).

A partir do 14º dia de injeção de LPS em dias alternados, o infiltrado inflamatório se torna mais pronunciado nas duas linhagens. Histologicamente é possível identificar a presença de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos em ambas as linhagens, e macrófagos nos animais da linhagem Swiss.

A perda de nível ósseo alveolar a partir de 14 dias de indução, fica mais pronunciada na linhagem Swiss quando comparado àquela observada aos 7 dias. Para linhagem C57BL/6, é possível notar o início de perda de nível ósseo alveolar, porém sem perda de crista óssea alveolar na região interproximal de molares (Figura 5).

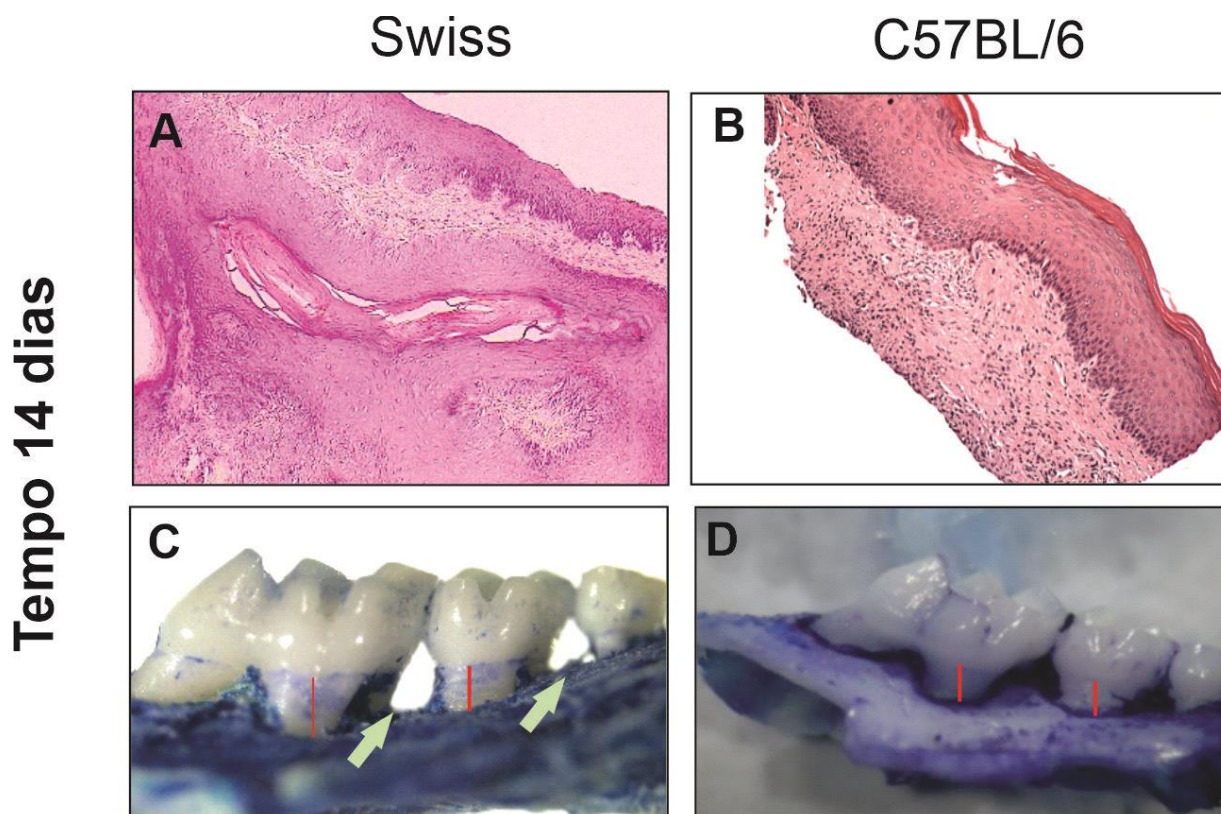


Figura 5- Fotomicrografia (Objetiva 10x) do tecido gengival da região entre molares superiores esquerdo nas linhagens Swiss (A) e C57/BL6 (B) e avaliação morfométrica da perda de nível ósseo alveolar nas linhagens Swiss (C) e C57BL/6 (D) para o grupo 14 dias, após injeção de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 14 dias no tecido gengival. A barra vermelha indica distância entre a crista óssea e junção cimento/esmalte; Seta verde indica reabsorção de crista óssea alveolar (espaço interproximal).

A partir do 21º dia de indução da doença periodontal, o infiltrado inflamatório se torna mais pronunciado. Ainda que a presença de neutrófilos seja um achado histológico em inflamação aguda, as injeções alternadas de LPS no tecido gengival estimularam a persistência destas células mesmo com 21 dias de doença, associados a linfócitos, eosinófilos e macrófagos, estes últimos presente, especialmente, na linhagem Swiss.

Aos 21 dias de indução, é facilmente perceptível a perda de nível ósseo alveolar em ambas as linhagens. Para linhagem Swiss é possível notar comprometimento de furca entre as raízes dos molares, compatível com periodontite Nível III ou IV, podendo também apresentar lesão de furca graus II ou III (Figura 6). Todos os sinais observados aos 21 dias de indução são também observados aos 28 dias, como pode ser observado na Figura 7, o que mostra a progressão da doença ao longo do tempo.

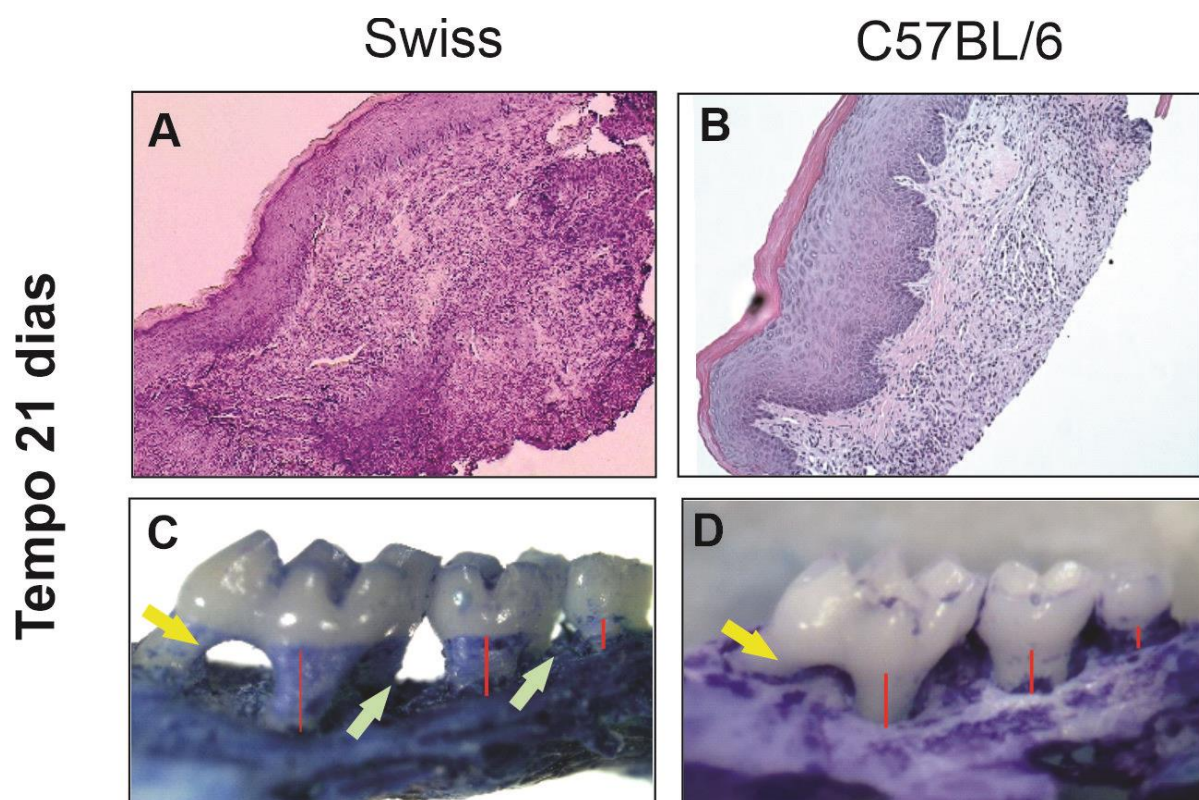


Figura 6- Fotomicrografia (Objetiva 10x) do tecido gengival da região entre molares superiores esquerdo nas linhagens Swiss (A) e C57/BL6 (B) e avaliação morfométrica da perda de nível ósseo alveolar nas linhagens Swiss (C) e C57BL/6 (D) para o grupo 21 dias, após injeção de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 21 dias no tecido gengival. Legenda: Barra vermelha indica distância entre a crista óssea e junção cimento/esmalte; Seta verde indica reabsorção de crista óssea alveolar (espaço interproximal); Seta amarela indica lesão de furca entre as raízes dos molares superiores.

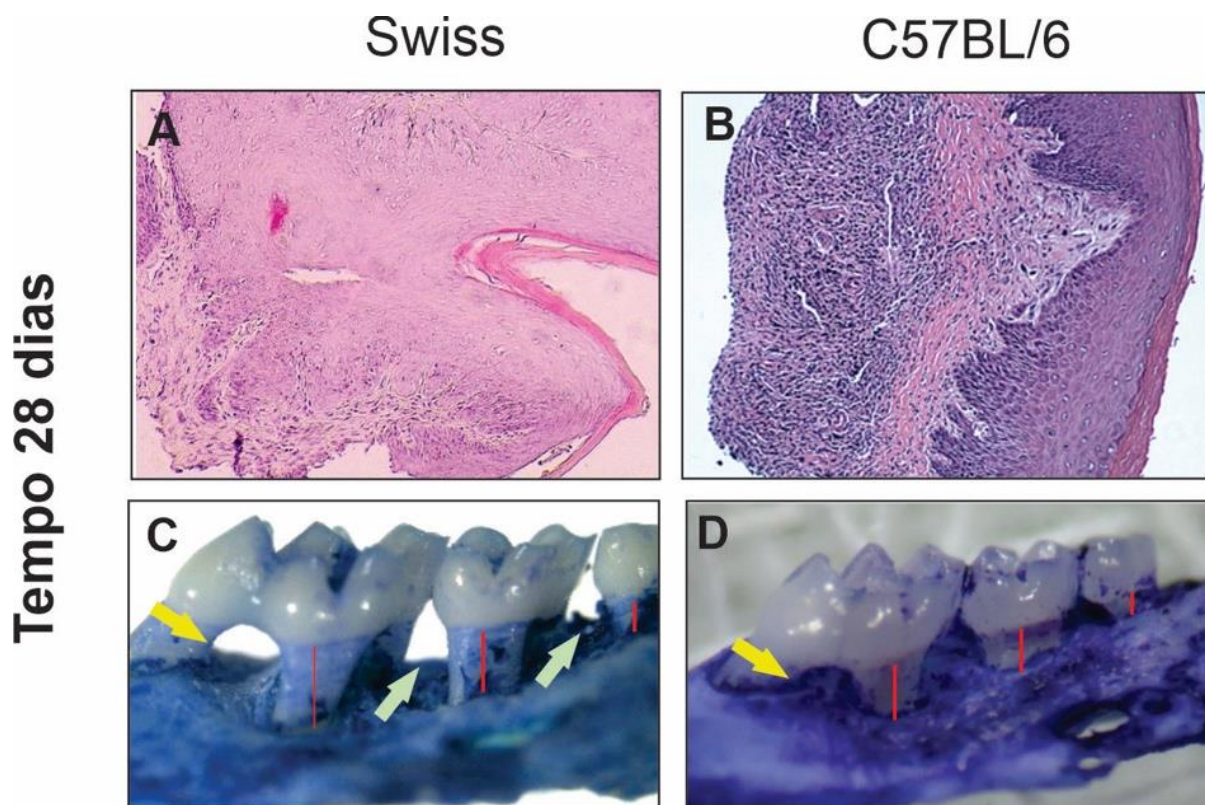


Figura 7- Fotomicrografia (Objetiva 10x) do tecido gengival da região entre molares superiores esquerdo nas linhagens Swiss (A) e C57/BL6 (B) e avaliação morfométrica da perda de nível ósseo alveolar nas linhagens Swiss (C) e C57BL/6 (D) para o grupo 28 dias, após injeção de LPS (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 28 dias no tecido gengival. Legenda: Barra vermelha indica distância entre a crista óssea e junção cimento/esmalte; Seta verde indica reabsorção de crista óssea alveolar (espaço interproximal); Seta amarela indica lesão de furca entre as raízes dos molares superiores.

A Figura 8 compara a perda de nível ósseo alveolar entre os grupos das linhagens Swiss e C57BL/6. Os resultados mostraram que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos 7 dias ($p < 0,05$), 14 dias ($p < 0,05$), 21 dias ($p < 0,001$) e 28 dias ($p < 0,001$), porém não existe diferença estatística entre o grupo naïve e grupo controle.

Portanto, estudos cujo objetivo é induzir a doença periodontal utilizando injeções de LPS poderão excluir o grupo Naïve da pesquisa, desde que utilizem a metodologia proposta no presente estudo.

A perda de nível ósseo alveolar foi mais mais pronunciada na linhagem Swiss, quando comparada a linhagem C57BL/6, o que sugere maior responsividade ao LPS para linhagem Swiss.

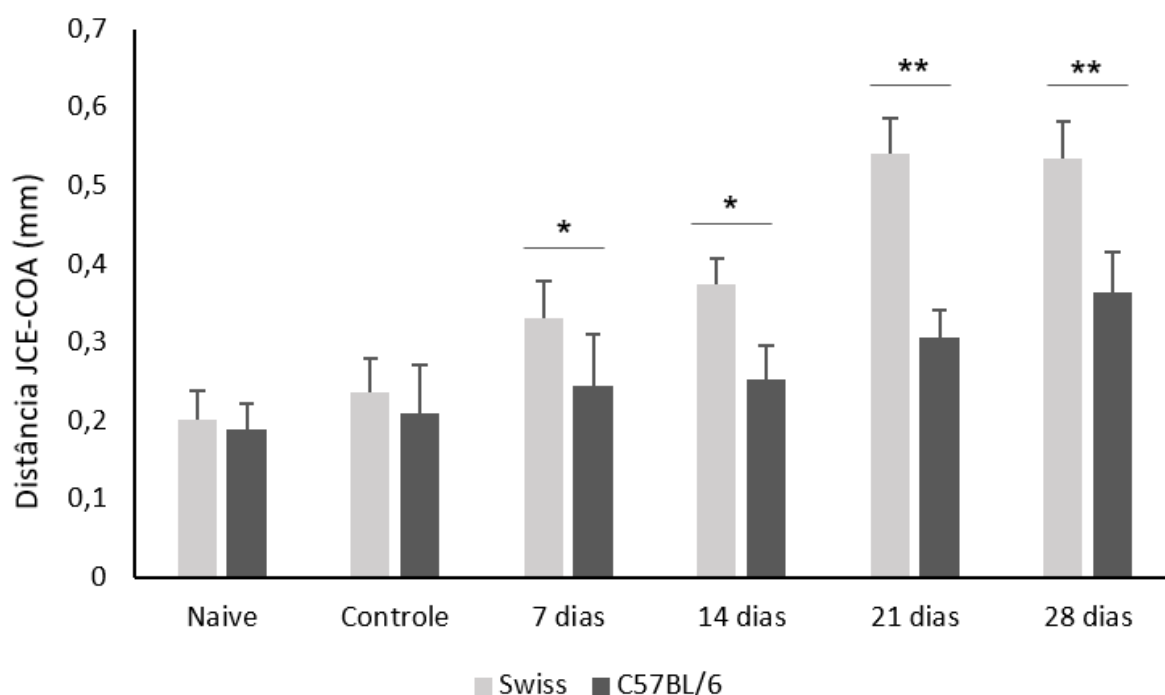


Figura 8: Comparação entre a perda de nível ósseo alveolar induzida por LPS nos diferentes tempos para as linhagens Swiss e C57BL/6. Naive: animais sem intervenção; Controle: animais que receberam injeção de LPS por 7 dias no tecido gengival do lado esquerdo e cujo material do lado direito foi usado como controle do experimento; JCE- Junção cimento/esmalte; COA- Crista óssea alveolar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

A Figura 9 apresenta a comparação da perda de nível ósseo alveolar na linhagem Swiss. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $p < 0,001$) entre os grupos 21 e 28 dias, quando comparados aos grupos naive e controle.

Cabe salientar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 21 e 28 dias, sendo esses dados bastante similares, portanto, para a linhagem Swiss, o modelo de indução de doença periodontal com injeção de LPS poderia parar aos 21 dias de indução, o que otimiza o tempo de estudo.

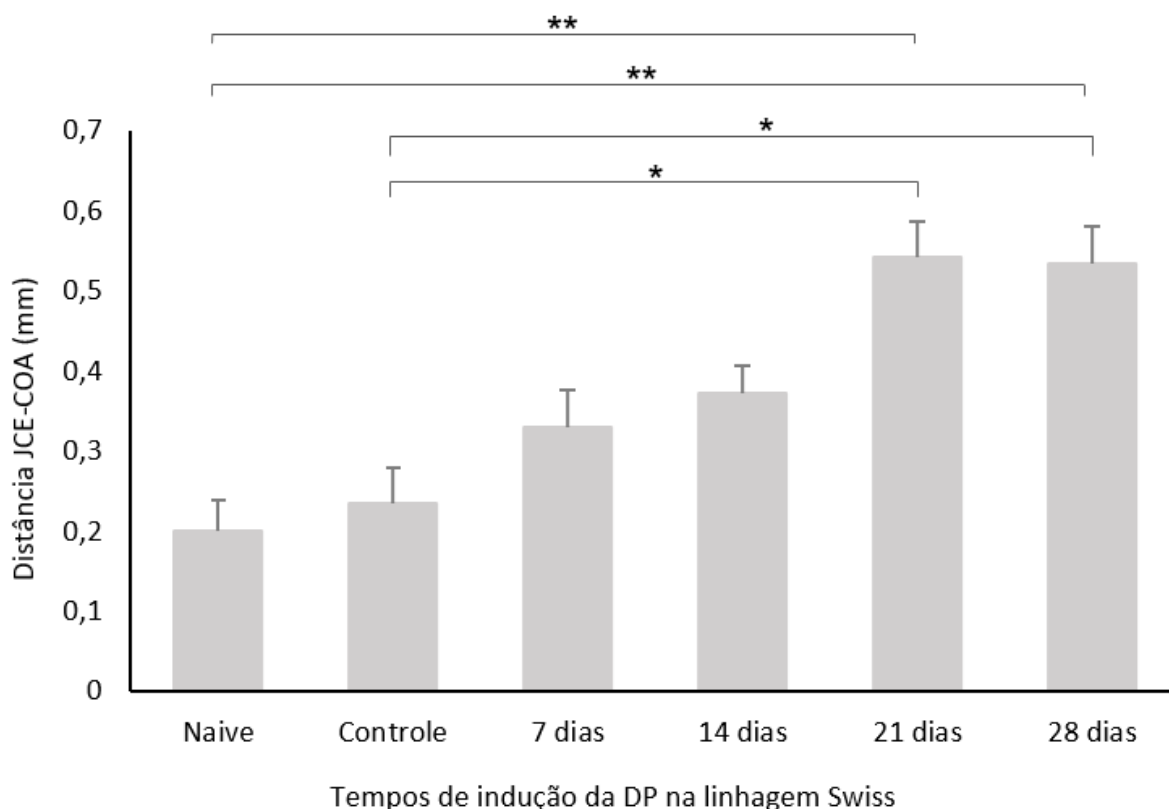


Figura 9: Comparação entre a reabsorção óssea induzida por LPS nos diferentes tempos para a linhagem Swiss. Naive: animais sem intervenção; Controle: animais que receberam injeção de LPS por 7 dias no tecido gengival do lado esquerdo e cujo material do lado direito foi usado como controle do experimento; JCE- Junção cimento/esmalte; COA- Crista óssea alveolar; DP- doença periodontal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Em relação a linhagem C57BL/6, a Figura 10 apresenta a comparação da perda de nível ósseo alveolar nesta linhagem. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; $p < 0,001$) entre todos os grupos, exceto entre os grupos naive e controle, o que reforça a exclusão do grupo naive para estudos de indução de doença periodontal com injeção de LPS na linhagem C57BL/6, desde que a pesquisa adote a metodologia proposta no presente estudo.

Contudo, diferente da linhagem Swiss, a Figura 10 mostra que apesar de não ter ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os grupos 21 e 28 dias, a perda de nível ósseo continua progredindo para a linhagem C57BL/6, portanto o modelo de indução de doença periodontal com injeção de LPS nessa linhagem deve ser estendido até 28 dias de indução.

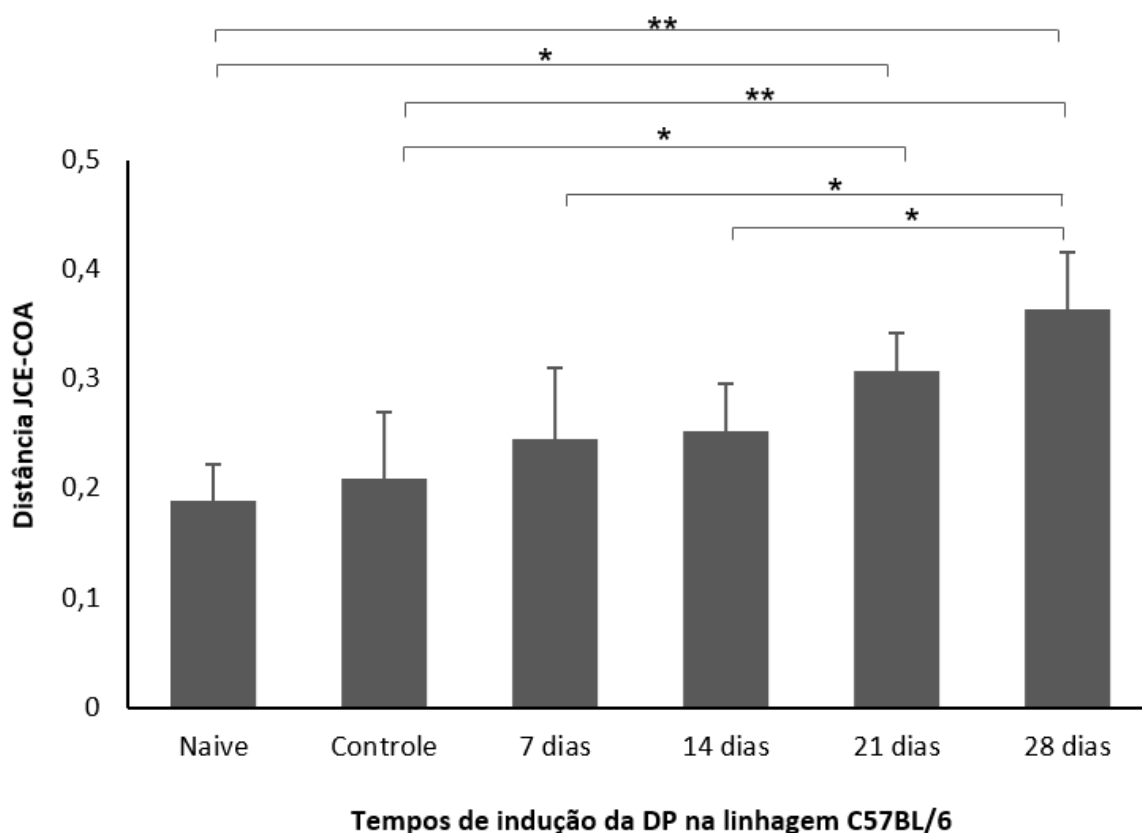


Figura 10: Comparação entre a reabsorção óssea induzida por LPS nos diferentes tempos para a linhagem C57BL/6. Naive: animais sem intervenção; Controle: animais que receberam injeção de LPS por 7 dias no tecido gengival do lado esquerdo e cujo material do lado direito foi usado como controle do experimento; JCE- Junção cimento/esmalte; COA- Crista óssea alveolar; DP- doença periodontal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

4 DISCUSSÃO

O modelo de indução da doença periodontal em camundongos por meio de injeção de LPS em tecido gengival é consolidado e vem sendo realizado em diversos estudos (CASILI *et al*, 2020; TROMBETA e SILVA *et al*, 2011). É um método prático com a possibilidade de controlar as doses de LPS administradas e que se baseia nas propriedades imunogênicas do LPS, uma endotoxina bacteriana.

No entanto, a diversidade metodológica dos estudos já publicados, a exemplo os apresentados por Chi *et al* (2019) e Li *et al* (2024), mostra uma ausência de padronização, deixando a cargo do pesquisador qual método é o mais adequado a

sua pesquisa. Desta forma, este estudo traz uma análise comparativa da aplicação deste método em duas linhagens de camundongos, Swiss e C57BL/6.

Os resultados mostraram que, para ambas as linhagens, a partir do sétimo dia de indução, já é possível observar, histologicamente, a presença de um infiltrado inflamatório perivascular e um discreto infiltrado inflamatório tecidual consistente com o estabelecimento da gengivite inicial, a forma mais branda da doença periodontal (GASNER e SCHURE, 2022).

A avaliação da perda de nível ósseo alveolar mostrou ausência de perda óssea em camundongos da linhagem C57BL/6 e uma leve reabsorção óssea, periodontite inicial em camundongos Swiss. Ao comparar métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse, Foureaux e colaboradores (2014) concluíram que métodos histométricos, radiográficos e morfométricos não apresentaram resultados divergentes na avaliação da perda óssea alveolar, o que valida a metodologia utilizada neste trabalho.

Os resultados encontrados no presente estudo estão alinhados aos estudos de Baker *et al* (2000) sobre a resistência inata a reabsorção óssea alveolar apresentada por camundongos da linhagem C57BL/6 e o resultados observados por Viecei *et al* (2021), que não mostraram reabsorção óssea em camundongos C57BL/6 até o sétimo dia.

Enquanto que, para os animais da linhagem Swiss, já é possível visualizar o início precoce da doença periodontal, ou seja, a condição periodontal progrediu da gengivite para um estado de doença inflamatória crônica, destrutiva e irreversível, similarmente ao que ocorre na doença periodontal em humanos, resultado de uma resposta imune exacerbada frente a presença de um biofilme dental disbiótico, localizado subgengivalmente (GASNER E SCHURE, 2022).

O surgimento da gengivite e periodontite inicial era esperado, visto que o LPS bacteriano, quando injetado no tecido gengival, é capaz de estimular uma resposta inflamatória envolvendo a cascata de ativação da via TLR-CD14-LPS-MyD88.

O LPS é reconhecido inicialmente pelo receptor CD14, que pode estar presente na superfície de células imunes como macrófagos e células dendríticas, facilitando a ligação do LPS ao Toll-Like Receptor 4 (TLR4). Essa interação é mediada por uma complexa formação que inclui o CD14 e outras proteínas, como MD-2 (DUAN *et al*, 2022; FERRAZ *et al*, 2011; GODOWSKI, 2005)

A ativação do TLR4 é essencial para iniciar a sinalização intracelular. Após

essa ativação, a proteína MyD88 é recrutada para o domínio TIR (Toll/IL-1 receptor) do TLR4, o que permite a formação de um complexo de sinalização que inclui outras proteínas adaptadoras, como IRAK (cinase associada ao receptor da Interleucina-1) e TRAF (Fator associado ao receptor do TNF), com ativação do fator de transcrição NF-kB (DUAN *et al*, 2022; FERRAZ *et al*, 2011; GODOWSKI, 2005).

A ativação do fator de transcrição NF-kB pode estar envolvido no surgimento da gengivite e periodontite inicial, visto que este fator promove a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas, o que explica a presença do infiltrado perivascular e tecidual no grupo 7 dias e ausência no grupo controle.

A ausência de infiltrado inflamatório e de reabsorção óssea alveolar verificada no grupo controle é uma condição condizente com saúde periodontal (CHAPPLE *et al*, 2018).

Esse achado é importante em futuros estudos que utilizam o modelo de indução com injeção de LPS em tecido gengival, visto que foi possível afirmar que o grupo 7 dias pode ser utilizado tanto para o estudo do processo inflamatório, quando se utiliza o hemiarco esquerdo do animal (lado que recebeu injeção de LPS), quanto para o estudo de saúde periodontal, quando se utiliza o hemiarco direito, que não recebeu estímulo.

Este procedimento é vantajoso do ponto de vista de tempo de estudo, custos envolvidos com a pesquisa, menor quantidade de animais na experimentação, respeitando o que preconiza a Resolução normativa brasileira do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) nº 25, de 29 de setembro de 2015 sobre o uso racional de animais.

Possivelmente, o processo inflamatório instalado em ambas as linhagens, poderia também influenciar na composição do microbioma subgengival, com consequente disbiose do biofilme dental e ativação exacerbada da resposta imune, resultando em dano progressivo (ZHANG *et al*, 2024), que quando associado a injeção de LPS em dias alternados, explicaria a progressão da doença periodontal nos dias subsequentes, visto que a partir do sétimo dia, houve um aumento do infiltrado inflamatório e perda do nível ósseo alveolar.

Ao longo do experimento foi observado aumento do infiltrado inflamatório, considerado por Li *et al* (2024), como um dos principais fatores para o desenvolvimento da doença periodontal.

Kolte *et al* (2014) mostraram que contagem total de leucócitos, neutrófilos,

linfócitos e eosinófilos é aumentada na doença periodontal quando esta contagem é comparada ao estado de saúde periodontal. Para os autores a contagem de células sanguíneas oferece uma visão limitada sobre o estado de saúde periodontal e geral do indivíduo, sendo necessária avaliação de outros parâmetros, no entanto a contagem pode ser utilizada como marcador de risco para o desenvolvimento de doenças sistêmicas ou prever a necessidade de intervenções terapêuticas precoces.

Também foi observada progressão gradativa de perda do nível ósseo alveolar, a qual foi mais pronunciada para a linhagem Swiss, em que, a partir do 21º dia de indução, já foi possível observar lesão de furca graus II ou III, compatível com periodontite Nível III ou IV, a qual está diretamente associada ao aumento do risco de perda dentária (SILVA, 2014; RODRIGUES *et al*, 2020). Lesões de furca não foram observadas para linhagem C57BL/6, o que reforça os achados de Baker *et al* (2000), sobre a resistência inata a reabsorção óssea alveolar dos camundongos C57BL/6.

Um achado histológico importante é a presença permanente de neutrófilos, especialmente a partir do 7º dia. Neutrófilos liberam para o meio extracelular enzimas proteolíticas, a exemplo das metaloproteinases de matriz (MMPs) e elastase, que degradam a matriz extracelular e rompem a barreira epitelial (WILLIAMS *et al*, 2021; YIN *et al*, 2022), promovendo dano tecidual. A presença persistente desta célula nos cortes histológicos pode ser explicada pelo uso constante de LPS até o 28º dia.

Macrófagos e linfócitos também foram observados nos cortes histológicos. Estas células são capazes de promover a diferenciação dos osteoclastos pela estimulação de RANKL, promovendo reabsorção óssea (LI *et al*, 2024).

Sommer *et al* (2019), em seus estudos com ratos Wistar, relatam que no infiltrado celular na doença periodontal há variação na população de linfócitos a depender do estágio da doença. Os autores mostraram que na evolução da gengivite para doença periodontal é observado um aumento de linfócitos Th1 ativados, associado a um aumento de IL-17, com consequente reabsorção óssea alveolar.

Em relação ao método em si, foi possível observar que para induzir a doença periodontal na linhagem Swiss, são necessários 21 dias, e para esta linhagem, a perda do nível ósseo alveolar é mais acelerada quando comparada a linhagem C57BL/6, em que são necessários 28 dias de indução. Desta forma, a seleção do modelo estará na dependência dos objetivos do pesquisador. Não se considera aqui qual é o melhor modelo, e sim, aquele que se aplica melhor aos objetivos da pesquisa,

considerando a cinética de cada um.

Por serem isogênicos, os camundongos da linhagem C57BL/6, são mais utilizados em pesquisas cujo objetivo seja compreender a etiopatogênese de uma doença e para desenvolver tratamentos e diagnósticos (DOS SANTOS, 2002).

Cabe salientar que os animais da linhagem Swiss ganham mais peso ao longo do experimento (dados observados) quando comparado a linhagem C57BL/6, conseqüentemente, o volume de anestésico e o tempo para anestesia são maiores, o que pode ser uma desvantagem.

Ainda são poucos os estudos que comparam a eficiência do uso de cada linhagem de camundongos como modelo animal. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que comparassem o uso das linhagens Swiss e C57BL/6 para o modelo de indução de doença periodontal com injeção de LPS em tecido gengival.

Estudos como este apresentado são importantes para auxiliar pesquisas em periodontologia, servindo para o desenvolvimento de novas ferramentas de estudo ampliando a compreensão da fisiopatologia da doença periodontal e facilitando a proposição de novas terapias.

5 CONCLUSÃO

Este estudo oferece uma contribuição para pesquisas com modelos animais na área de periodontologia e aponta diferenças marcantes quanto ao uso da linhagem Swiss e C57BL/6. A progressão da doença é diferente em cada linhagem, e a opção por usar uma em detrimento de outra está relacionada aos objetivos da pesquisa, respeitando a cinética do modelo.

Na comparação entre as linhagens de camundongos C57BL/6 e Swiss, o estudo da perda de nível ósseo alveolar induzida por injeção de lipopolissacarídeos, mostrou que os animais Swiss são mais sensíveis a indução da doença, apresentando perda óssea a partir de 7 dias de indução e com lesão de furca pronunciada a partir do 21º dia de indução. Portanto, usar a linhagem Swiss pode otimizar tempo e custo operacional em estudos relacionados a doença periodontal.

Estudos futuros são necessários para avaliar os aspectos imunológicos, como a produção de citocinas e a relação desta produção com a disbiose do biofilme dental subgengival, bem como a avaliação das linhagens submetidas a intervenções terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (BioproFar-BA, TO-PIE0001/2024)

REFERÊNCIAS

- BECERRA-RUIZ, J. S. et al. Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. **Oral diseases**, v. 28, n. 6, p. 1441–1447, 2021.
- BAKER, P. J.; DIXON, M.; ROOPENIAN, D. C. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5864–5868, 2000.
- BRITO, T. P. DE; LIMA, F. DOS S.; ROCHA, C. C. DA. Modelos Experimentais Em Animais Para Pesquisa Na Área De Periodontia E Implantodontia: Revisão De Literatura. **Revista CPAQV - Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, v. 13, n. V13N2, p. 1, 2021.
- CARVALHO, J. S. **Ingestão de flavonoides cítricos sobre a modulação da resposta inflamatória e nível de perda óssea promovida por doença periodontal induzida em camundongos saudáveis** / Araraquara: [s.n.], 2020 75 f.; 30 cm. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
- CHAPPLE, I. L. C. et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, v. 89 Suppl 1, p. S74–S84, 2018.
- CHI, L. et al. Increased cortical infarction and neuroinflammation in ischemic stroke mice with experimental periodontitis. **Neuroreport**, v. 30, n. 6, p. 428–433, 10 mar. 2019.
- CONCEA. Resolução Normativa CONCEA n. 25, de 29 de setembro de 2015 **in** **NORMATIVAS DO CONCEA** – 3ª EDIÇÃO – Brasília, 26 de setembro de 2016. Produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa.
- CASILI, G. et al. Treatment with luteolin improves lipopolysaccharide-induced periodontal diseases in rats. **Biomedicine**, v. 8, n. 10, 2020.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.
- DOS SANTOS, B.F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 115-118.
- DUAN, T. et al. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.
- FERRAZ, E. et al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **RGO**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 2011.
- FOUREAUX, R. C. et al. Comparação de métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse. **Arquivos em Odontologia**, v. 50, n. 4, p. 185–192, 2014.
- GASNER, N. S.; SCHURE, R. S. Periodontal disease. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

GODOWSKI, P. J. A smooth operator for LPS responses. **Nature immunology**, v. 6, n. 6, p. 544–546, 2005.

HAJISHENGALLIS, G. Illuminating the oral microbiome and its host interactions: animal models of disease. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 3, May 2023, fuad018. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad018>

KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. **Periodontology 2000**, v. 68, n. 1, p. 66–82, 2015.

KOLTE, R.; KOLTE, A.; DESHPANDE, N. Assessment and comparison of anemia of chronic disease in healthy subjects and chronic periodontitis patients: A clinical and hematological study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 2, p. 183, 2014.

LI, S.; HUA, Y.; LIAO, C. Weakening of M1 macrophage and bone resorption in periodontitis cystathionine γ -lyase-deficient mice. **Oral diseases**, v. 30, n. 2, p. 769–779, 2024.

NEURATH, N.; KESTING, M. Cytokines in gingivitis and periodontitis: from pathogenesis to therapeutic targets. **Frontiers in immunology**, v. 15, p. 1435054, 2024.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 754857, 2011.

RODRIGUES, A. L. de M.; et al. Lesões em áreas de furca: fatores etiológicos, diagnóstico e tratamento. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 635–640, 2020.

SILVA G. P. et al. Classificação e tratamento das lesões de furca. **Rev Ciênc Saúde.**; 16(2):112-28, 2014.

SOMMER, M. E. L. et al. Immune response mediated by Th1 / IL-17 / caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. **Archives of oral biology**, v. 97, p. 77–84, 2019.

TROMBETA E SILVA, J. et al. LPS induces greater bone and PDL loss in SPARC-null mice. **Journal of dental research**, v. 90, n. 4, p. 477–482, 2011.

VIECELI, P. S. et al. Physalis angulata reduces the progression of chronic experimental periodontitis by immunomodulatory mechanisms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 273, p. 113986, 2021.

VERÍSSIMO, M. H. G., et al. Emprego da indução de doença periodontal experimental em camundongos para estudos clínicos: métodos e resultados. **Revista Brasileira De Pesquisa Em Saúde**, 23(4), 98–104, 2022.

WILLIAMS, D. W. et al. Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. **Cell**, v. 184, n. 15, p. 4090- 4104.e15, 2021.

YIN, L.; LI, X.; HOU, J. Macrophages in periodontitis: A dynamic shift between tissue destruction and repair. **The Japanese dental science review**, v. 58, p. 336–347, 2022.

ZHANG, M. et al. An update on periodontal inflammation and bone loss. **Frontiers in immunology**, v. 15, p. 1385436, 2024.

CONCLUSÕES GERAIS

- A prospecção tecnológica da 7-hidroxicumarina (Umbeliferona) evidenciou que esse bioativo é versátil, e apresenta diversas propriedades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidantes, antimicrobiana e inibidores da formação de biofilme, além de possuir propriedades analgésicas e estimulantes da síntese de colágeno, o que pode contribuir significativamente para o tratamento clínico da doença periodontal. Apesar dessas descobertas promissoras, há uma escassez de documentos de patentes relacionados ao uso de Umbeliferona no tratamento da doença periodontal, ressaltando a necessidade imperativa de mais exploração científica sobre todo o potencial deste composto.
- A indução de doença periodontal experimental em camundongos é um método científico importante para a análise e desenvolvimento de novas pesquisas na área da periodontia em seres humanos. Na comparação entre as linhagens de camundongos C57BL/6 e Swiss, o estudo da perda de nível ósseo alveolar induzida por injeção de lipopolissacarídeos, mostrou que os animais Swiss são mais sensíveis a indução da doença, apresentando perda óssea a partir de 7 dias de indução e com lesão de furca pronunciada a partir do 21º dia de indução. Portanto, usar a linhagem Swiss pode otimizar tempo e custo operacional em estudos relacionados a doença periodontal.
- O composto 7-hidroxicumarina, nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, utilizado no tratamento dos animais com doença periodontal experimental induzida por LPS, inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e promoveu a liberação de citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para uma redução na progressão da reabsorção óssea alveolar. Além disso, a administração diária de 7-hidroxicumarina não ocasionou perda de peso entre os animais tratados. Esses achados promissores indicam que a 7-hidroxicumarina possui potencial como agente bioativo no aprimoramento da terapia periodontal, trazendo perspectivas favoráveis para um manejo mais eficaz da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

BRASIL. 2024. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Estratégias e Políticas de Saúde Comunitária. SB Brasil 2023 : Pesquisa Nacional de Saúde Bucal : relatório final [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Departamento de Estratégias e Políticas de Saúde Comunitária. – Brasília : Ministério da Saúde, 537 p. : il.

BROOKES, Z. et al. Mouthwash effects on the oral microbiome: Are they good, bad, or balanced? **International dental journal**, v. 73 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S74–S81, 2023.

CARDOSO, M. C. A. C. et al. Estudo da prevalência de alterações periodontais em pacientes acometidos por acidente vascular cerebral isquêmico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e36910515153, 2021.

CARVALHO-FILHO, P.C.; TRINDADE, S. C. Imunologia das doenças bucais de origem bacteriana. In: TRINDADE, S.C; CARVALHO-FILHO, P. C. (Org.). **Fundamentos de imunologia para odontologia**. Curitiba. Editora CRV, 2024. p. 109-126.

DAWIDOWICZ, A. L.; BERNACIK, K.; TYPEK, R. Umbelliferone instability during an analysis involving its extraction process. **Monatshefte fur chemie**, v. 149, n. 8, p. 1327–1340, 2018.

EKE, P. I. et al. Periodontitis in US adults: National health and nutrition examination survey 2009-2014. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 149, n. 7, p. 576- 588.e6, 2018.

GASNER, N. S.; SCHURE, R. S. Periodontal disease. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

GBD 2017 ORAL DISORDERS COLLABORATORS et al. Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease 2017 study. **Journal of dental research**, v. 99, n. 4, p. 362–373, 2020.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of oral microbiology**, v. 3, 2011.

JURD, L.; KING, A. D., Jr; MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. **Phytochemistry**, v. 10, n. 12, p. 2965–2970, 1971.

KAHHAROVA, D. et al. Microbial indicators of dental health, dysbiosis, and early childhood caries. **Journal of dental research**, v. 102, n. 7, p. 759–766, 2023.

KANIMOZHI, G. et al. Umbelliferone modulates gamma-radiation induced reactive oxygen species generation and subsequent oxidative damage in human blood lymphocytes. **European journal of pharmacology**, v. 672, n. 1–3, p. 20–29, 2011.

KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. **Periodontology** 2000, v. 68, n. 1, p. 66–82, 2015.

KÖNÖNEN, E.; GURSOY, M.; GURSOY, U. Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 8, p. 1135, 2019.

KORNICKA, A. et al. Umbelliferone and its synthetic derivatives as suitable molecules for the development of agents with biological activities: A review of their pharmacological and therapeutic potential. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 12, p. 1732, 2023.

KUMAR, S. et al. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. **International journal of dental hygiene**, v. 11, n. 1, p. 35–40, 2013.

KWON, T.; LAMSTER, I. B.; LEVIN, L. Current concepts in the management of periodontitis. **International dental journal**, v. 71, n. 6, p. 462–476, 2021.

LANG, N. P.; BARTOLD, P. M. Periodontal health. **Journal of periodontology**, v. 89 Suppl 1, p. S9–S16, 2018.

LICCARDO, D. et al. Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, 2019.

LIU, Y. et al. The interplay between oral microbes and immune responses. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 2022.

MATSUSHITA, K. et al. Periodontal disease and periodontal disease-related bacteria involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of inflammation research**, v. 13, p. 275–283, 2020.

MILUTINOVICI, R.-A. et al. Vegetal compounds as sources of prophylactic and therapeutic agents in dentistry. **Plants**, v. 10, n. 10, 2021.

PEREIRA, A. L.; VILELA- JÚNIOR, R. DE A. Relação da doença periodontal com complicações gestacionais: revisão Integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 5, p. e10364, 2022.

SAKAUE, Y. et al. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an in vitro study. **BMC oral health**, v. 18, n. 1, p. 52, 2018.

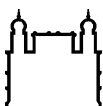
SOARES, V. et al. Umbelliferone esters with antibacterial activity produced by lipase-mediated biocatalytic pathway. **Biotechnology Letters**. 43(2):469–477. 2021

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189–197, 2018.

VASCONCELOS, J. F. et al. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 609, n. 1–3, p. 126–131, 2009.

WU, Z. et al. Scopoletin and umbelliferone protect hepatocytes against palmitate- and bile acid-induced cell death by reducing endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 436, n. 115858, p. 115858, 2022.

ZHU, Y. et al. Innovative biomaterials for the treatment of periodontal disease. **Frontiers in dental medicine**, v. 4, 2023.



Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM / FIOCRUZ

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 012-2022**PROJETO:** “Avaliação do potencial imunomodulador da 7-hidroxycumarina em modelo animal de doença periodontal induzida por lipopolissacarídeo”**COORDENADOR:** Milena Botelho Pereira Soares

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo isogênico Swiss 25g	60 F
Camundongo isogênico C57BL/6 25g	81 F
Total	141 F

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) em 06/12/2022 e tem validade até 06/12/2026.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 12/06/2022, being valid until 12/06/2026.

ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:**Vigência:** 06/12/2022 a 06/12/2026**Relatório Parcial:** 06/12/2024**Relatório Final:** 06/12/2026

Salvador, 06 de dezembro de 2022

Natália Machado Tavares
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A737BB9

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A737BB9**

Usuário: **UFBA**

CPF/CNPJ: **15.180.714/0001-04**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**

Finalidade do Acesso:



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Blechnum occidentale

Adiantum latifolium

Typha domingensis

Cenostigma gardnerianum

Lonchocarpus araripensis

Zanthoxylum tingoassuiba

Physalis angulata

Dictyoloma vandellianum

Stillingia loranthaceae

Croton velutinus

Simaba bahiensis

Blechnum occidentale

Adiantum latifolium
Zanthoxylum tingoassuiba
Physalis angulata

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

CTA de origem não identificável

CTA de origem não identificável

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Investigação farmacológica de produtos naturais de origem vegetal com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias**

Equipe

Cristiane Flora Villarreal	UFBA
Fabiana Regina Nonato	Instituto Gonçalo Moniz
Angélica Maria Lucchese	Universidade Estadual de Feira de Santana
Carlos Eduardo Cordeiro Oliveira	Universidade Estadual de Feira de Santana
Ricardo Ribeiro dos Santos	Instituto Gonçalo Moniz
Milena Botelho Pereira Soares	Instituto Gonçalo Moniz
Tâmara Magalhães Oliveira Nogueira	Instituto Gonçalo Moniz
Luis Antônio Rodrigues de Freitas	Instituto Gonçalo Moniz
José Maria Barbosa Filho	Universidade Federal da Paraíba
Xirley Pereira Nunes	Universidade Federal da Paraíba
Ana Maria Giulietti	Universidade Estadual de Feira de Santana
Glória Emília Petto de Souza	Universidade de São Paulo
Flavia Oliveira de Lima	Universidade Estadual de Feira de Santana
Ricardo David Couto	Universidade Federal da Bahia
Cristiane Metzker de Oliveira	Universidade Federal da Bahia
Juceni Pereira Lima David	Universidade Federal da Bahia
Jorge Maurício David	Universidade Federal da Bahia
Clayton Q. Alves	Universidade Estadual de Feira de Santana
Luciano Paganucci de Queiroz	Universidade Estadual de Feira de Santana
Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida	Universidade Federal do Vale do São Francisco
Luis Cezar Rodrigues	Universidade Federal da Paraíba

Renan Fernandes do Espírito-Santo	Instituto Gonçalo Moniz
Cassio Santana Meira	Instituto Gonçalo Moniz
Rafael dos Santos Costa	Universidade Federal da Bahia
Otávio Passos Souza Filho	Universidade Federal da Bahia
Gustavo Henrique Goulart Trossini	Universidade São Paulo
Glaucio Monteiro Ferreira	Universidade de São Paulo
Eudes da Silva Velozo	Universidade Federal da Bahia
Milena da Silva Lima	Universidade Federal da Bahia
Afranio Ferreira Evangelista	Instituto Gonçalo Moniz
Gisele Graca Leite dos Santos	Instituto Gonçalo Moniz
Paulo José Lima Juiz	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Renata Campos Nogueira	Instituto Gonçalo Moniz
Luiza Carolina França Opretzka	Universidade Federal da Bahia
Olivia Azevedo Nascimento	Universidade Federal da Bahia
Lucas Silva Abreu	Universidade Federal da Paraíba
Iura Muniz Alves	Universidade Federal da Bahia
Leonardo de Oliveira Aguiar	Universidade Federal da Bahia
Dara Leite Fontes	Universidade Federal da Bahia
Josean Fachine Tavares	Universidade Federal da Paraíba
Marcelo Sobral da Silva	Universidade Federal da Paraíba
Yuri Manguiera do Nascimento	Universidade Federal da Paraíba
Gessica Sabrina de Assis Silva	Universidade Federal da Bahia
Dourivaldo Silva Santos	Universidade Federal da Bahia
Pedro Santana Sales Lauria	Universidade Federal da Bahia
Diego Agnelo	Universidade Federal da Bahia
Rafaele Rebello Pereira	Universidade Federal da Bahia
Ivone Maria Ribeiro	Farmanguinhos, FIOCRUZ
Therezinha Coelho Barbosa Tomassini	Farmanguinhos, FIOCRUZ
Mireille Le Hyaric	Universidade Federal de Juiz de Fora

Parceiras Nacionais

14.045.546/0001-73 / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

33.781.055/0006-40 / Instituto Gonçalo Moniz

Parceiras no Exterior

Eberhard Karls Universität Tübingen

Data do Cadastro: **23/10/2018 16:37:07**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:32** de **19/04/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**