



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**RAFAELA FRANCO MOREIRA**

**EFEITOS DO BIOATIVO TROXERUTINA NO MODELO DE PERIODONTITE  
INDUZIDA POR LIGADURA EM CAMUNDONGO SWISS**

**FORTALEZA**

**2024**

RAFAELA FRANCO MOREIRA

EFEITOS DO BIOATIVO TROXERUTINA NO MODELO DE PERIODONTITE  
INDUZIDA POR LIGADURA EM CAMUNDONGO SWISS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M839e Moreira, Rafaela Franco.  
EFEITOS DO BIOATIVO TROXERUTINA NO MODELO DE PERIODONTITE INDUZIDA POR  
LIGADURA EM CAMUNDONGO SWISS / Rafaela Franco Moreira. – 2024.  
47 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

Coorientação: Profa. Dra. Conceição da Silva Martins Rebouças.

1. perda óssea alveolar. 2. troxerrutina. 3. flavonoide. 4. inflamação. 5. estresse oxidativo. I. Título.  
CDD 611

---

RAFAELA FRANCO MOREIRA

EFEITOS DO BIOATIVO TROXERUTINA NO MODELO DE PERIODONTITE  
INDUZIDA POR LIGADURA EM CAMUNDONGO SWISS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Aprovada em: 27/02/2024

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Heliáda de Vasconcelos Chaves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, meu dileto amigo, como também a todos os meus familiares, amigos e professores que me apoiaram durante essa jornada.

## AGRADECIMENTOS

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

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, autor da minha vida, cujo diálogo diário me permitiu dar um passo além, na certeza de que nunca estaria em desamparo e cujas promessas irei cumprir afim de honrar Sua misericórdia e todas as bênçãos que recaem todos os dias sobre mim e minha família. À Ele toda honra, toda graça e todo louvor.

Meus sinceros agradecimentos a Universidade Federal do Ceará, instituição que abriga mentes brilhantes, pesquisadores renomados e respeitados mundialmente, por ter me sido meu lugar de aprendizado durante os anos de minha formação, onde pude abrir minha visão de mundo e ampliar meus conhecimentos científicos.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais, nas pessoas que o compõem, pela dedicação aos alunos.

À Profa. Dra. Gerly Anne Brito, primeira pessoa a me estender a mão e acreditar no meu potencial intelectual.

Minha eterna gratidão também à Profa. Dra. Renata Leitão, minha orientadora, pessoa de mais alto nível intelectual, que, ao me aceitar como orientanda, pôde mudar o curso da minha história.

À Profa. Dra. Josy, pós doc do nosso laboratório e minha coorientadora, cuja humildade, paciência e generosidade em partilhar seu conhecimento foram cruciais para a minha jornada acadêmica.

Às professoras que compuseram minha banca, Profa. Dra. Mirna Bezerra, Profa. Dra. Fátima Regina Oliveira, Profa. Dra. Ana Beatriz Duarte e Profa. Dra. Hellíada Chaves pela valiosa contribuição, pelos comentários, sugestões e correções que, certamente enalteceram ainda mais o meu trabalho.

A todos os professores pesquisadores que me ensinaram através de suas expertises e que, com muita resiliência, superam todos os obstáculos e continuam a fazer pesquisa de qualidade no Brasil.

A todos os colabores da universidade, desde os que nos recebem na entrada e cuidam da nossa segurança, até àqueles que cuidam da limpeza. Também quero deixar meus agradecimentos à Laisa, secretária do nosso programa de pós graduação e que nos auxilia sempre com tanta presteza e solicitude.

De modo muito especial quero agradecer ao meu querido amigo André Tavares, pela parceria diária e ajuda constante, as quais me transformaram enquanto ser humano e, cuja delicadeza no trato, gentileza, nobreza de alma e amizade irei levar para sempre em minha vida.

Quero agradecer à minha querida amiga Mayra Côrtes, irmã que a pós graduação me deu, pela amizade, parceria, apoio, carinho, por sempre lembrar de mim e também por sempre me fazer lembrar do meu potencial como pesquisadora e como professora.

Aos meus amigos de laboratório Maick, Luana, Kayse, Sandro, Ariana, Dennis, Dvison, Luciane, Ludmila e Luiz pela ajuda durante os experimentos, pelas risadas e trocas de experiências. E aos amigos Bruno e Cezanildo, os quais compartilharam comigo algumas disciplinas e me ajudaram bastante durante as aulas remotas. Irei levá-los para sempre em meu coração.

Aos meus amigos pessoais, das Equipes de Nossa Senhora, Bia, Eugênio, Sandra, André, Natália, Gilmário, Renata, Tiago, Claudío, Regiane e Pe. Felipe, pelas orações, pelo suporte emocional e vibrações positivas sempre emanadas com tanto carinho pelo meu sucesso profissional.

À minha melhor amiga Claudinha, cujas palavras de carinho, apoio e incentivo sempre verbalizadas em nossos encontros, foram um bálsamo em tantos momentos.

À minha avó Gabriela (*in memoriam*), que, sempre me incentivou a estudar, a ser independente e a correr atrás dos meus sonhos. Imagino que, de onde ela estiver, deva estar orgulhosa da minha trajetória e certamente intercede por mim. Vozinha, ainda sinto muito a sua falta.

Aos meus pais, João Andrade e Rosa Maria, cujo amor incondicional, os valores morais, éticos e religiosos forjaram meu caráter e pautaram a minha personalidade. Sou muito grata a vocês pela família que formaram e pelos momentos de amor vividos quando estamos reunidos.

Às minhas queridas irmãs Gabriela, Isabela e Mikaela, pelo apoio incondicional, pelas palavras de encorajamento, pela cumplicidade, amor e disponibilidade em ajudar. Vocês são as melhores irmãs que alguém poderia ter.

Aos meus cunhados Jofre, Flavio e Bruno, também aos meus sobrinhos Guilherme, Flavinha, Thomas e Daniel pelo carinho.

Ao meu esposo Marcus pela parceria, pela capacidade de compreender minhas ausências e aceitar as minhas escolhas. Por permanecer ao meu lado todos esses anos, por acreditar em mim e por não desistir mesmo com tantas adversidades ao longo da nossa caminhada conjugal.

Aos meus filhos, Davi e Mariana, meu maior legado, minha maior riqueza, minha maior realização. É por eles que acordo todos os dias e é por eles que tento ser uma pessoa melhor a cada dia. Eles são a minha maior inspiração e dão sentido à minha existência nesse mundo enquanto ser humano. Sou muito grata a Deus pelo dom da maternidade.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, você estará fazendo o impossível.” (São Francisco de Assis)

## RESUMO

A periodontite é uma doença imuno inflamatória crônica que afeta os tecidos de sustentação e proteção dos dentes. A ação biológica dos flavonoides desponta como uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios. A Troxerrutina, flavonoide semissintético obtido a partir da rutina e largamente encontrada em vários alimentos, tem surgido como um bioativo promissor, uma vez que estudos revelam seus efeitos antioxidantes, antiedematogênicos e anti-inflamatórios. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anti-inflamatórios e osteoprotetores da Troxerrutina na periodontite experimental e os possíveis mecanismos associados. Para tanto foram usados 40 camundongos Swiss dispostos aleatoriamente em cinco grupos. A periodontite foi induzida através da colocação de um fio de algodão 3.0 na cervical dos primeiros molares inferiores de camundongos Swiss anestesiados com Ketamina (100mg/kg, i.p.) e Xilazina (10mg/kg; i.p.). Os grupos experimentais receberam Troxerrutina solução nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg, por gavagem, uma vez ao dia, começando 1 hora antes da indução até o 10º dia. Os grupos controles incluíram animais não submetidos à ligadura (Naive) e animais que, submetidos à indução da periodontite, receberam a administração por via oral de solução salina (Salina), uma vez ao dia, até a eutanásia. No 11º dia, todos os animais foram eutanasiados por exsanguinação, sob anestesia. As hemiarcadas foram removidas e processadas para as análises morfométricas, histopatológicas (HE) e para a investigação da expressão gênica de RANKL e OPG por PCR em tempo real (RT-PCR). O tecido gengival em torno dos primeiros molares foi coletado para determinar as concentrações do marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA) e marcador antioxidante, glutathiona reduzida (GSH). A dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea foi avaliada a partir do sangue coletado do plexo orbital no 11º dia. Os resultados revelaram que a Troxerrutina, na dose de 150mg/kg, demonstrou eficácia na preservação do osso alveolar. Além disso, essa dose foi capaz de reduzir a atividade da fosfatase alcalina óssea induzida pela periodontite, associada a maiores concentrações de glutathiona reduzida (GSH), indicativo de um ambiente redox favorável. Adicionalmente, a Troxerrutina (150 mg/kg) foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, evidenciada pela diminuição da concentração de malondialdeído (MDA). Estes achados sugerem que a Troxerrutina desempenha um papel osteoprotetor na periodontite induzida, possivelmente mediado por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, contribuindo para a manutenção da homeostase óssea em condições inflamatórias.

**Palavras-chaves:** perda óssea alveolar; inflamação; estresse oxidativo; flavonoide; troxerrutina.

## ABSTRACT

Periodontitis is a chronic immune-inflammatory disease that affects the supporting and protective tissues of the teeth. The biological activity of flavonoids has emerged as a promising alternative against inflammatory processes. Troxerutin, a semi-synthetic flavonoid derived from rutin and widely found in various foods, has emerged as a promising bioactive since studies have revealed its antioxidant, anti-edematogenic, and anti-inflammatory effects. For this purpose, 40 Swiss mice were randomly allocated into five groups. Periodontitis was induced by placing a 3.0 cotton thread in the first lower molars of Swiss mice anesthetized with Ketamine (100mg/kg; i.p.) and Xylazine (10mg/kg; i.p.). The control groups included animals that had not undergone ligature-induced (Naive) and animals that had undergone periodontitis induction and received oral administration of saline solution (Salina) once a day until euthanasia. On the 11th day, all the animals were euthanized by exsanguination under anesthesia. The hemiarcs were removed and processed for morphometric and histopathological analyses (HE) and RANKL and OPG gene expression investigation by real-time PCR (RT-PCR). The gingival tissue around the first molars was collected to determine the lipid peroxidation marker, malondialdehyde (MDA), and the antioxidant marker, reduced glutathione (GSH) concentrations. Serum bone alkaline phosphatase levels were assessed using blood collected from the orbital plexus on the 11th day. The results showed that Troxerutin effectively preserved alveolar bone at 150mg/kg. In addition, this dose reduced the activity of bone alkaline phosphatase induced by periodontitis, which is associated with higher concentrations of reduced glutathione (GSH) and indicates a favorable redox environment. In addition, Troxerutin (150 mg/kg) reduced lipid peroxidation, as evidenced by a decrease in malondialdehyde (MDA) concentration. These findings suggest that Troxerutin plays an osteoprotective role in induced periodontitis, possibly mediated by its anti-inflammatory and antioxidant properties, contributing to maintaining bone homeostasis in inflammatory conditions.

**Keywords:** alveolar bone loss; inflammation; oxidative stress; flavonoid; troxerutin.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Metabolismo Ósseo.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Periodontite.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1 Patogênese da Periodontite.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Troxerrutina.....</b>	<b>22</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Aspectos Éticos.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Preparação da Solução de Troxerrutina.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Protocolo Experimental da Periodontite Induzida por Ligadura.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Grupos Experimentais e Administração Oral da Troxerrutina.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Análise Morfométrica e Macroscópica do Osso Alveolar.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Análise Histopatológica.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7 Análise da Fosfatase Alcalina Óssea.....</b>	<b>29</b>
<b>4.8 Análise dos Níveis de Malondialdeído (MDA).....</b>	<b>29</b>
<b>4.9 Análise dos Níveis de Glutathione Reduzida (GSH).....</b>	<b>30</b>
<b>4.10 Análise Quantitativa da Expressão Gênica de RANKL e OPG.....</b>	<b>30</b>
<b>4.11 Análise Estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Aspectos Morfométricos.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Avaliação Histopatológicas.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3 Fosfatase Alcalina Óssea (FAO).....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 Concentração de Malondialdeído (MDA) e Glutathione Reduzida (GSH).....</b>	<b>35</b>
<b>5.5 Expressão Gênica de RANKL E OPG por qPCR.....</b>	<b>35</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>42</b>

<b>ANEXO I – APROVAÇÃO DO ESTUDO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....</b>	<b>47</b>
--	-----------

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Metabolismo Ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo composto por células e uma matriz extracelular calcificada. Dentre algumas de suas atribuições estão a sustentação e locomoção do corpo, além da proteção dos órgãos (BLUMER, 2021). O osso mineralizado é constituído por uma matriz proteica predominantemente composta por fibras de colágeno tipo I, dispostas em camadas de feixes lineares, e por elementos inorgânicos, com predomínio de fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita (BLUMER, 2021; WEITZMANN, 2013).

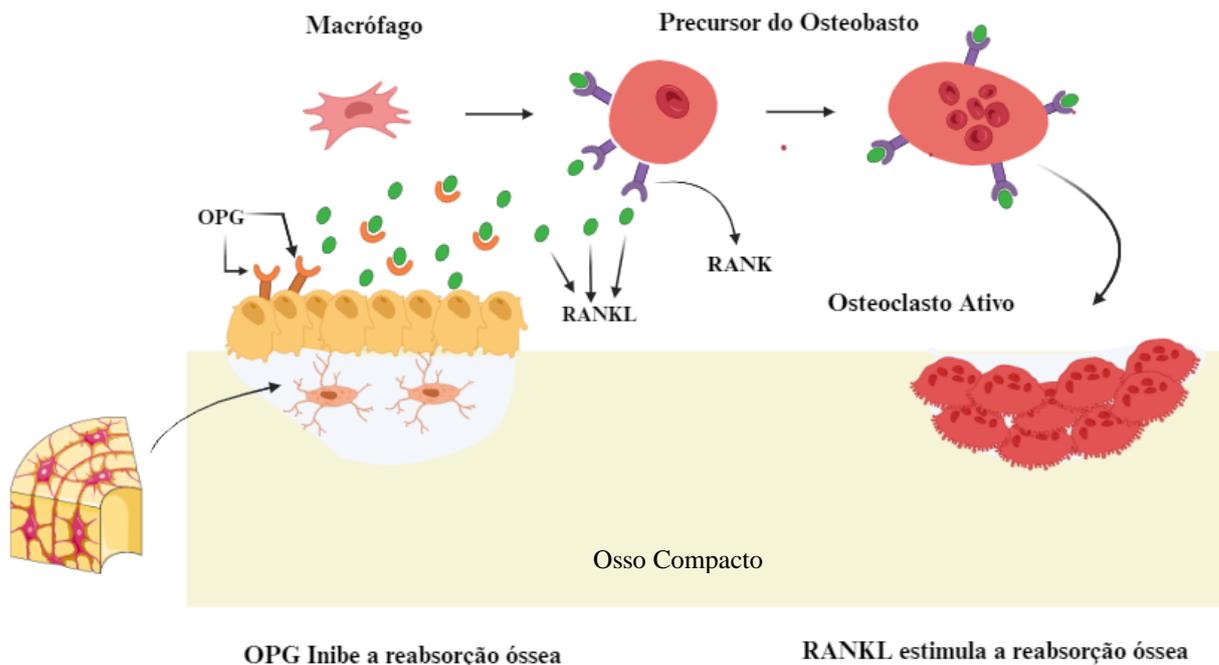
O osso é um tecido altamente dinâmico, que se adapta continuamente para preservar a homeostase mineral. Essa adaptação é alcançada através de dois processos fundamentais: a modelação e remodelação óssea. A modelação óssea é essencial para o crescimento e adaptação do esqueleto, ajustando a forma e o tamanho do osso conforme as necessidades do organismo. Por outro lado, a remodelação óssea é um processo fisiológico especializado, coordenado e necessário para a remoção e reparo do osso danificado a fim de manter a homeostase mineral (ERIKSEN, 2010; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Esse processo é caracterizado pela reabsorção do osso pelos osteoclastos e pela subsequente formação de novo tecido ósseo pelos osteoblastos, numa sequência coordenada de eventos que envolvem diferentes células para assegurar a substituição eficaz do osso danificado por um novo (ERIKSEN, 2010).

Os osteócitos, derivados dos osteoblastos e incorporados na matriz óssea, são células altamente especializadas que se comunicam com os osteoblastos e osteoclastos. Eles respondem a estímulos mecânicos e regulam a atividade dessas células, influenciando assim tanto a formação quanto a reabsorção óssea (BLUMER, 2021). Essa comunicação é crucial homeostasia óssea e para a manutenção da integridade estrutural do esqueleto, permitindo que o tecido ósseo se adapte às mudanças nas demandas mecânicas e mantenha sua função e saúde.

Além das células ósseas, a participação de células do sistema imunológico, como os linfócitos T e B, é igualmente significativa em diversas patologias ósseas. A interação complexa entre os sistemas esquelético e imunológico deu origem a um campo de pesquisa emergente denominado osteoimunologia. Este campo investiga a interconexão entre os processos de remodelação óssea e as respostas imunológicas, elucidando como o sistema imune pode influenciar a saúde óssea através de mecanismos inflamatórios e imunorregulatórios (GINALDI; DE MARTINIS, 2016; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Os linfócitos T, originários da medula óssea, são células imunes importantes que regulam a remodelação óssea tanto em condições normais quanto em situações patológicas (GINALDI; DE MARTINIS, 2016; PACIFICI, 2010). Considerando esse panorama, pode-se afirmar que o eixo RANK/RANKL/OPG pode ser estimulado ou inibido por diferentes mediadores. A presença de mediadores inflamatórios como as interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) facilita a reabsorção óssea, pois aumentam a expressão de RANKL e, em contrapartida, diminuem a expressão de OPG. Assim, a resposta imunológica do organismo diante de um processo inflamatório desempenha um papel crucial no desenvolvimento de doenças de natureza inflamatória, como a periodontite, enfatizando a importância da interação entre sistemas imunológico e esquelético na patogênese dessas condições (THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

Os progressos na elucidação dos mecanismos de comunicação entre osteoblastos e osteoclastos têm sido estimulados pela identificação e análise detalhada de uma série de proteínas estreitamente associadas ao fator de necrose tumoral (TNF) e ao seu receptor (TNFR). Essas moléculas, que incluem a osteoprotegerina (OPG), o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e o ligante do RANK (RANKL), desempenham um papel crucial na regulação da função dos osteoclastos.(BOYCE; XING, 2007; THEILL; BOYLE; PENNINGER, 2002). O sistema RANK/RANKL/OPG é fundamental para o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, sendo que o RANKL, liberada pelos osteoblastos, ao se ligar ao seu receptor RANK presente nos precursores dos osteoclastos, promove a formação, a ativação e a sobrevivência dessas células. Por outro lado, a OPG, igualmente liberada pelos osteoblastos, possui estrutura homóloga ao RANK, atuando de forma a inibir a ligação do RANKL ao RANK, impedindo a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (BELIBASAKIS; BOSTANCI, 2012; GINALDI; DE MARTINIS, 2016; LEIBBRANDT; PENNINGER, 2008). O equilíbrio entre RANKL e OPG é essencial para a homeostase óssea. Um desequilíbrio em favor do RANKL pode levar à perda óssea, enquanto um desequilíbrio em favor da OPG pode promover a formação óssea excessiva Além dos osteoblastos, RANKL é produzido por outros tipos de células como fibroblastos e células B e T (BELIBASAKIS; BOSTANCI, 2012). A figura 1 é uma representação esquemática da via de sinalização RANK/RANKL/OPG, ilustrando a liberação de RANKL e OPG por osteoblastos.



**Figura 1: Representação esquemática da via de sinalização RANKL/OPG.** O sistema RANK/RANKL/OPG regula a formação e reabsorção óssea. O RANKL, liberado por osteoblastos, se liga ao receptor RANK nos precursores de osteoclastos, promovendo sua formação, ativação e sobrevivência. Em contrapartida, a OPG, também liberada por osteoblastos, tem estrutura semelhante ao RANK e inibe a ligação do RANKL ao RANK, impedindo a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Existem biomarcadores para o metabolismo ósseo. A formação óssea pode ser avaliada através das concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea (FAO), uma glicoproteína, localizada na membrana dos osteoblastos (SARDIWAL et al., 2013). A atividade da FAO é um indicador valioso da formação óssea, refletindo a atividade osteoblástica e por isso, desempenha um papel crucial no acompanhamento e avaliação do processo de regeneração óssea, especialmente em situações patológicas (VIMALRAJ, 2020).

## 1.2 Periodontite

A Periodontite é uma condição inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes resultante de um desequilíbrio da microbiota oral (CHOI et al., 2021; GATEJ et al., 2018), é altamente prevalente e afeta, aproximadamente, 90% da população mundial (PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W, 2005; THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

O desenvolvimento da periodontite pode ser evitado mediante o tratamento eficaz da gengivite, sua condição precursora. No entanto, muitos pacientes só buscam tratamento quando a doença está em estágio avançado, já que nos estágios iniciais ela costuma ser

assintomática (NAZIR et al., et al., 2020). É importante salientar que nem todas as manifestações leves de periodontite progridem necessariamente para formas mais graves. Contudo, estas podem ser consideradas a continuidade de uma mesma doença (VICENTE OPPERMANN, 2007). No entanto, é pertinente considerá-las como estágios distintos da mesma condição patológica.

Inúmeros fatores podem desencadear o desenvolvimento de doenças periodontais, incluindo o uso de algumas medicações, como ciclosporina e dolantina, doenças como a diabetes e o HIV, condições comportamentais como o tabagismo, higiene oral deficiente e stress, além de situações específicas como idade avançada, gravidez e menopausa (FERES et al., 2016; NAZIR, 2017; VICENTE OPPERMANN, 2007).

A periodontite é uma doença inflamatória que afeta profundamente os tecidos de suporte dos dentes, resultando na perda de tecido conjuntivo, incluindo o osso alveolar, o que resulta na formação de bolsas ou fendas entre a gengiva e a raiz do dente. Isso pode causar dor, desconforto, dificuldade na mastigação e eventual perda dentária (LANG; BARTOLD, 2018; PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W, 2005). Tem natureza multifatorial e envolve uma intrínseca relação entre a microbiota oral, a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (LANG; BARTOLD, 2018). A figura 2 apresenta uma ilustração comparativa entre um periodonto saudável e outro afetado pela periodontite.



**Figura 2: Ilustração mostrando a diferença entre um periodonto saudável, representado no lado esquerdo, e um acometido com periodontite, mostrado no lado direito.** Esta imagem destaca os contrastes entre as condições saudáveis e doentes, com detalhes como, gengivas firmes e rosadas versus inflamadas e recuadas, e a presença versus perda de osso alveolar. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

A saúde bucal é de grande importância no contexto da saúde global, já que os problemas nessa área geralmente são prevalentes na população, sobretudo nos grupos de maior vulnerabilidade socioeconômica. Apesar de haver poucos estudos epidemiológicos a nível nacional, focados na saúde bucal, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)

realizou em 2013 um levantamento epidemiológico da saúde bucal dos brasileiros e constatou 16 que, cerca de 160 milhões de indivíduos, em sua maioria mulheres, pessoas acima de 60 anos, moradores da zona rural, desfavorecidos financeiramente e com baixa escolaridade, haviam perdido mais de 13 dentes ou eram edêntulos. Observa-se que, em áreas menos desenvolvidas, a extração dentária muitas vezes se torna a única opção quando não há acesso a tratamentos conservadores para uma parte da população mais necessitada (NICO et al., 2016).

A prevalência do edentulismo no Brasil é a mais alta se comparada a outros países da América Latina e, apesar de alguns fatores contribuírem para este fim, a população entre 15-44 anos parece estar alcançando patamares mais baixos. Por outro lado, em populações idosas, o mesmo não é observado e estima-se que a haja um aumento na prevalência de edentulismo nessa parcela da população até 2040 (MARCELINO et al., 2023).

A periodontite é comum em adultos e ocupa a 31ª posição entre as principais causas de anos vividos com incapacidade no mundo (FERES et al., 2016). No último levantamento sobre a saúde oral da população brasileira, observou-se que 48,7% dos adultos brasileiros apresentaram perda de inserção periodontal com significado patológico (MARCELINO et al., 2023).

Com a prevalência e a gravidade aumentando com a idade, é crucial priorizar o tratamento e a prevenção. Somente nos EUA, 46% dos adultos têm periodontite, totalizando 64,7 milhões de pessoas (FERES et al., 2016). A gengivite afeta até 95% da população de norte-americanos, enquanto a periodontite grave chega a atingir entre 60% a 65% da população de pessoas com 65 anos ou mais (LANG; BARTOLD, 2018). A prevalência e a gravidade da periodontite variam globalmente, sendo mais comum em países em desenvolvimento. No entanto, entre as populações indígenas, essa condição pode apresentar uma incidência menor. Outro estudo revela que nos EUA a periodontite é mais prevalente em homens do que em mulheres, em afro-americanos e mexicanos-americanos do que em brancos (PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W, 2005).

A periodontite pode impactar a saúde sistêmica, aumentando o risco de aterosclerose, diabetes e desfechos indesejados durante a gestação (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013). Um estudo aponta que a microbiota intestinal possa estar relacionada à periodontite devido a um desequilíbrio na regulação imunológica. A perturbação da microbiota intestinal por bactérias responsáveis pela periodontite pode estabelecer uma conexão entre a periodontite a doenças sistêmicas (THIELE; RAUNER; GOES, 2018). Um desequilíbrio da microbiota oral pode ainda promover a invasão de bactérias através da barreira hematoencefálica. Foi sugerido uma intrínseca relação entre a doença de Alzheimer e a periodontite, devido a liberação de

proteínas pró inflamatórias, como as IL6, proteína C reativa e TNF- $\alpha$ , as quais contribuem para os processos inflamatórios envolvidos (LEIRA et al., 2017).

O tratamento da periodontite pode mitigar a inflamação e regenerar parte dos tecidos, mas a restauração completa do suporte dentário perdido é inviável, o que leva à perda dos dentes (PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W, 2005).

A perda dentária também impacta negativamente no bem-estar de indivíduos afetados, uma vez que afeta a fala, a deglutição, além de contribuir para uma baixa autoestima, causando danos psicológicos e sociais (CORTEZ et al., 2023).

Atualmente existem várias terapias disponíveis para o tratamento da periodontite, incluindo antibióticos e anti-inflamatórios não esteroidais. No entanto, esses medicamentos podem causar resistência bacteriana, bem como toxicidade renal e gástrica. Por isso, há um forte interesse da comunidade científica em realizar estudos que explorem formulações naturais derivadas de plantas medicinais para o tratamento da periodontite. (TEIXEIRA et al., 2017a).

Sabendo-se que a periodontite surge como uma reação imuno-inflamatória do organismo ao desequilíbrio da microbiota oral, pode-se inferir que os modelos experimentais específicos para esta doença sejam particularmente eficazes para investigar a interação entre o sistema imunológico e o osso. Esses modelos oferecem uma plataforma valiosa para aprofundar nosso entendimento sobre como as respostas imunológicas influenciam a saúde óssea, incluindo o contexto das alterações provocadas pela periodontite. (THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

### **1.2.1 Patogênese da Periodontite**

Vários fatores podem contribuir para a origem da periodontite. Anteriormente, acreditava-se que ela era principalmente causada pelo acúmulo de bactérias anaeróbias, em sua maioria gram-negativas, como *Agregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Apesar do papel crucial da disbiose oral no estabelecimento da periodontite, ela por si só não é capaz de desencadear a doença. Um hospedeiro suscetível é igualmente essencial, e é a interação entre essa susceptibilidade e a disbiose que irá definir a evolução da periodontite (THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

A periodontite se manifesta quando as bactérias periodontopáticas presentes na área afetada desencadeiam uma resposta imuno-inflamatória no organismo, resultando na levando à destruição das estruturas de suporte dos dentes. Esse processo normalmente culmina em sinais clínicos, como o sangramento gengival. Tanto o indivíduo afetado quanto as bactérias

envolvidas na doença liberam enzimas que danificam os tecidos e atraem células do sistema imunológico para o local afetado.

Embora essa resposta seja principalmente protetora, a exposição prolongada às bactérias, juntamente com certos fatores de risco, pode levar à degradação dos tecidos, impulsionada por moléculas inflamatórias. Quando a inflamação predominantemente mediada por linfócitos T e macrófagos, a progressão da doença tende a ser mais lenta e controlável. Por outro lado, se a resposta inflamatória for mediada principalmente por linfócitos B e plasmócitos, é provável que ocorra uma lesão mais severa e destrutiva (PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W, 2005).

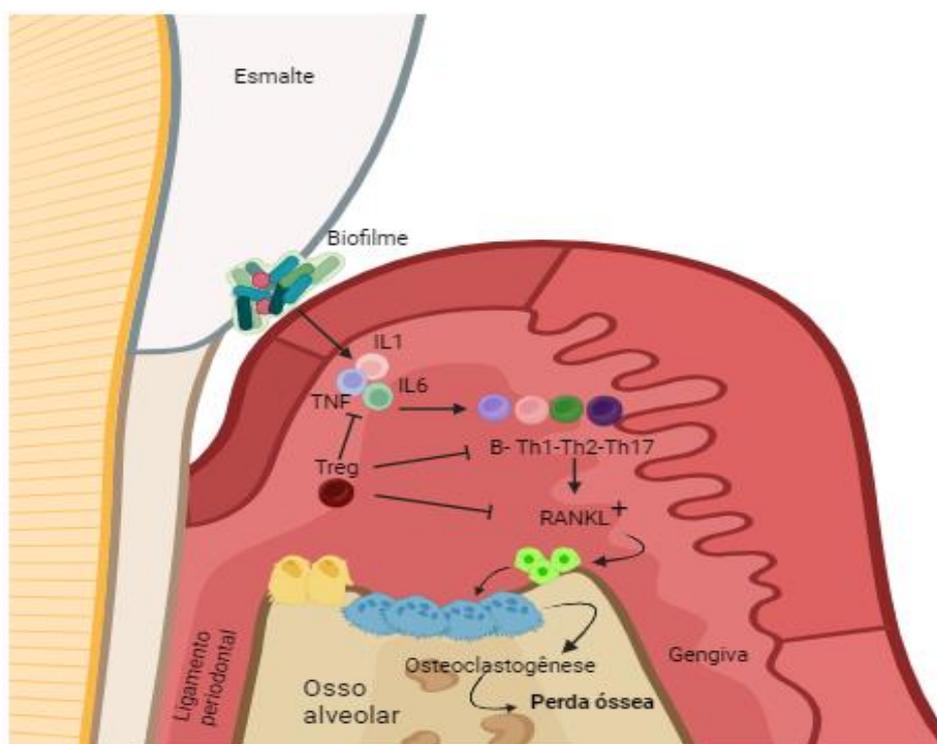
Neste cenário, tanto o hospedeiro quanto as bactérias são capazes de desencadear reações imunológicas em resposta à presença prolongada do biofilme nos tecidos periodontais. Inicialmente, há um recrutamento de leucócitos para a área, predominantemente de neutrófilos e linfócitos para a região comprometida. A persistência do biofilme pode neutralizar, no entanto, a ação dos neutrófilos. As células dendríticas de Langerhans, por sua vez, capturam o material antigênico microbiano presente no epitélio oral para apresentá-lo aos linfócitos, visando induzir uma resposta imunológica apropriada. Caso o desafio microbiano persista, isso pode levar à progressão da periodontite e, eventualmente, à perda dos dentes. (THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

Uma vez ativa a resposta imune adaptativa, observa-se a ação das células Th1 e Th2 que se diferem com base nos seus padrões de citocinas. Enquanto as células Th1 promovem a destruição óssea, as células Th2 minimizam a perda óssea. Em parte, a progressão da periodontite pode ser mediada pelo desequilíbrio entre Th1 e Th2. Além dessas células, outro subconjunto de células Th, como as células Th17 e as células Tregs, podem também ser implicados nesse processo (LIMA; LARA, 2013).

As células Th17 têm por função proteger o tecido contra bactérias e fungos extracelulares, produzindo citocinas específicas. Estas células parecem estar envolvidas em distúrbios autoimunes e inflamatórios, induzindo a expressão de RANKL em osteoblastos e fibroblastos sinoviais. A IL-17, citocina liberada pela Th17, aumenta a inflamação local, bem como, a produção de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, as quais também aumentam a expressão de RANKL, promovendo, assim, a osteoclastogênese. Em suma, as células Th17 são os mediadores principais da perda óssea induzida pela periodontite (THIELE; RAUNER; GOES, 2018).

As células Tregs suprimem a ativação e proliferação algumas células imunes, tendo papel importante na manutenção da homeostase, tanto em condições normais quanto em

condições patológicas. Além disso, elas limitam as respostas imunes, regulam o metabolismo ósseo, inibindo a osteoclastogênese, controlando, assim, a inflamação em lesões periodontais. Um ambiente rico de citocinas IL-6 pode inibir a ação das Tregs, portanto, a diminuição de suas concentrações no periodonto pode contribuir para uma resposta imunológica exacerbada, favorecendo a progressão ou mesmo reativação da enfermidade (THIELE; RAUNER; GOES, 2018). A figura 3 é uma representação esquemática mostrando a patogênese da periodontite.



**Figura 3: Representação esquemática da patogênese da periodontite.** O biofilme nos tecidos periodontais desencadeia reações imunológicas, recrutando leucócitos, mas sua persistência pode neutralizar a ação dos neutrófilos. A resposta imune adaptativa envolve Th1, Th2, Th17 e Tregs. Th1 promove a destruição óssea, Th2 minimiza a perda óssea. Th17 induz a expressão de RANKL, promovendo osteoclastogênese e perda óssea. Tregs inibem a osteoclastogênese e controlam a inflamação. A diminuição das Tregs pode exacerbam a resposta imunológica, favorecendo a progressão da periodontite. *Fonte:* Elaborado pelo autor, baseado no trabalho de THIELE; RAUNER; GOES, 2018.

Nesse contexto, fundamental destacar que os eventos inflamatórios podem levar ao estresse oxidativo, um aspecto bem estabelecido na patogênese da periodontite (TEIXEIRA et al., 2017b). Os radicais livres de oxigênio comprometem componentes biológicos essenciais, como os lipídios e proteínas. Isso resulta em um desequilíbrio entre os processos de oxidação e os mecanismos antioxidantes, favorecendo a oxidação. A mensuração desses marcadores nos tecidos sob investigação é crucial, tanto para avaliar a presença de condições patológicas quanto

para testar a eficácia de intervenções farmacológicas. Especificamente, o malondialdeído (MDA), um indicador significativo da peroxidase lipídica, em altas concentrações, pode induzir a ativação de genes reguladores da inflamação e da resposta imune (YOSHIKAWA; NAITO, 2002).

Para defender o organismo contra os radicais livres, há uma série de antioxidantes endógenos, entre os quais se destaca a glutathiona reduzida (GSH). O GSH atua diretamente contra os agentes oxidantes e seus produtos, com o objetivo de reprimir a geração de radicais livres nos tecidos. Assim, ele desempenha um papel essencial na salvaguarda do interior das membranas celulares, protegendo as células contra danos oxidativos (YOSHIKAWA; NAITO, 2002). Portanto, as concentrações de GSH servem como indicadores do estresse oxidativo, sendo que níveis mais baixos deste marcador sugerem um aumento do estresse oxidativo no organismo.

Diversos estudos têm explorado o potencial de compostos bioativos, como os flavonoides, no tratamento da periodontite. TANG et al., 2024 observaram os efeitos do extrato de flavonoides da própolis em ratos, enquanto (NAPIMOGA et al., 2013) utilizaram quercetina em um modelo de periodontite em camundongos. Além disso, TASKAN; GEVREK, 2020 avaliaram os efeitos da quercetina em um modelo de periodontite por ligadura induzida. Todos esses estudos mostraram efeito osteoprotetor em suas análises. Já AKINCIBAY; ŞENEL; AY, 2007 e RAUNER et al., 2014 investigaram o uso de quitosana e curcumina, respectivamente, em associação com tratamento conservador, como a destartarização, em pacientes com periodontite. Esses estudos demonstraram uma melhora significativa nos parâmetros clínicos dos pacientes, sem relato de efeitos colaterais. Essas descobertas fornecem evidências promissoras sobre o potencial terapêutico desses compostos na periodontite, tanto em ensaios pré-clínicos quanto em ensaios clínicos.

Nosso grupo de pesquisa tem desempenhado um papel significativo na elucidação dos eventos inflamatórios associados à periodontite experimental. Dentre os nossos achados, destaca-se a identificação do papel crucial de citocinas específicas, particularmente a Interleucina-1 (IL-1), o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Interleucina-6 (IL-6), no processo inflamatório (LEITÃO et al., 2005; LIMA et al., 2000; MARTINS et al., 2016).

### **1.3 Troxerrutina**

Há milênios se faz uso espécies vegetais e essa prática tem sido adotada em diversas áreas de estudo, como é o caso da medicina e cosmética. O Brasil é uma país de grande

biodiversidade, com flora medicinal riquíssima e abundante. O cerrado brasileiro, a maior savana do mundo, é conhecido como berçário de espécies de plantas cujos princípios ativos promovem ações terapêuticas de relevância para a comunidade científica. Uma parte do cerrado encontra-se no estado do Ceará e o uso de formulações a partir de plantas derivadas desse bioma contribui para a conservação dessas espécies, do meio ambiente, além de impactar econômica e socialmente toda a região de cultivo desses vegetais (SANTI et al., 2023).

Diversos estudos indicam que as formulações naturais, com potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório, tem favorecido a prevenção e o tratamento doenças neurodegenerativas, gástricas e circulatórias (FARAJDOKHT et al., 2017; LU et al., 2011; MALINSKA et al., 2019; SHU et al., 2018). Em particular, a aplicação local ou oral de derivados naturais, como géis ou compostos específicos, tem sido estudada para prevenir a perda óssea em doenças inflamatórias, como a periodontite. Exemplos desses compostos incluem a curcumina, cujo uso tem sido documentado na literatura (BHATIA et al., 2014)

A Troxerrutina é um flavonoide semissintético obtido a partir da hidroxietilação do bioflavonoide Rutina, comumente conhecido como vitamina P4 (CHI et al., 2021). É derivado da *Dimorphandra gardneriana*, popularmente conhecida como fava d'anta (BIANCHI et al., 2018; DE MIRANDA et al., 2020) e *Sophora japonica*, comumente conhecida como acácia japônica (BIANCHI et al., 2018), presente em abundância no cerrado brasileiro (SANTI et al., 2023). A Troxerrutina está presente em vários produtos alimentares como chás, cafés, cereais, grãos e uma ampla variedades de vegetais e frutas (BABRI et al., 2014), como maçã, frutas cítricas e amora (AZIZ et al., 2015). Vale ressaltar que a Troxerrutina não possui atividade mutagênica e nem clastogênica, possui baixa citotoxicidade (MARZIN et al., 1987), e efeitos neuro protetores, uma vez que pode atingir o sistema nervoso através da barreira hematoencefálica (BABRI et al., 2014). Além disso, possui estabilidade química e solubilidade aquosa (YANG et al., 2021). Ademais, a Troxerrutina tem boa absorção gastrointestinal e é capaz de produzir efeitos benéficos sem prejudicar o organismo (DE MIRANDA et al., 2020; PANAT et al., 2016). Sua eficácia e segurança já foram avaliadas em idosos e mulheres grávidas, indicando bons resultados (PANAT et al., 2016).

Os flavonoides são largamente encontrados em cosméticos e medicamentos devido às suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e anti-angiogênicas (XIAO et al., 2010; YANG et al., 2021). Atualmente alguns flavonoides são usados para tratar doenças como flebite, insuficiência venosa crônica e hipercolesterolemia. Também são largamente utilizados em suplementos alimentares em virtude de sua ação antioxidante (ŠATÍNSKÝ et al., 2013).

Em um modelo de fratura óssea em ratos, a administração da Troxerrutina produziu bons resultados. No grupo tratado com Troxerrutina, as lacunas perto do local da fratura mostraram uma diminuição notável e a espessura do calo recém-formado mostrou um resultado significativo (YANG et al., 2021), nos permitindo pensar nos benefícios desse flavonoide em outros modelos de reparo ósseo, como é o caso da periodontite.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A saúde bucal é essencial para o bem-estar geral, reconhecendo que saúde e qualidade de vida transcendem aspectos puramente médicos. A periodontite, uma doença imuno-inflamatória que pode levar à perda dentária e aumentar o risco de doenças sistêmicas, destaca-se por sua prevalência global e por ser mais prevalente em idosos. Sua etiologia envolve biofilme bacteriano, genética e fatores ambientais, evidenciando a complexidade de seu manejo (CHOI et al., 2021; GATEJ et al., 2018).

No contexto do envelhecimento populacional e da busca por tratamentos eficazes, a exploração de terapias alternativas, especialmente aquelas derivadas da biodiversidade brasileira, torna-se crucial. A Troxerrutina, um flavonoide com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, emergiu como um tratamento potencialmente promissor para a periodontite, além de oferecer benefícios em outras condições vasculares e neurodegenerativas.

Este projeto visa explorar de forma inédita a eficácia da Troxerrutina no manejo da periodontite, potencializando a saúde bucal e, por extensão, a qualidade de vida dos pacientes, alinhando-se com as necessidades de saúde global e a valorização da biodiversidade local.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Investigar os efeitos anti-inflamatórios e osteoprotetores da Troxerrutina na periodontite induzida por ligadura em camundongos Swiss.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da Troxerrutina na perda óssea alveolar associada à periodontite induzida por ligadura, através de análises morfométricas;

- Investigar o impacto da Troxerrutina nos parâmetros inflamatórios relacionados à periodontite induzida por ligadura, por meio de análises histopatológicas;
- Verificar o impacto da administração oral de Troxerrutina na atividade osteoblástica, avaliando a atividade da Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) no soro de animais submetidos à periodontite induzida por ligadura;
- Investigar o efeito da administração oral da Troxerrutina sobre a concentração do marcador de peroxidação lipídica MDA e do marcador antioxidante GSH presentes no tecido gengival de animais submetidos à periodontite induzida por ligadura;
- Pesquisar o efeito da administração oral da Troxerrutina sobre o metabolismo ósseo, avaliando a expressão gênica de RANKL e OPG isolados a partir do osso alveolar de animais submetidos à periodontite induzida por ligadura.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo é um ensaio pré-clínico randomizado e controlado por grupos, realizado em camundongos Swiss. A randomização dos animais em diferentes grupos foi realizada para garantir a imparcialidade na distribuição dos tratamentos, enquanto o controle por grupos permitiu a comparação dos efeitos do fármaco em estudo com grupos controles positivos e negativos da doença. Esse delineamento rigoroso buscou assegurar a validade e a confiabilidade dos resultados obtidos, contribuindo para uma avaliação precisa da eficácia e segurança do bioativo sob investigação.

##### **4.1 Aspectos Éticos**

Este estudo foi realizado com 40 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, com peso entre 20g e 30g, com idade média de aproximadamente 5 a 8 semanas no início. Os animais, fornecidos pelo biotério do Porangabussu da Universidade Federal do Ceará, foram distribuídos aleatoriamente em grupos e alojados em caixas de polipropileno espaçosas (46x34x19) para garantir conforto e bem-estar. A instalação experimental foi mantida em condições laboratoriais controladas, com temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de  $50 \pm 5\%$ , e submetida a um ciclo claro/escuro de 12 horas para imitar as condições naturais. Durante todo o estudo, os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água padrão de laboratório. Todos os procedimentos relacionados com animais seguiram as diretrizes

ARRIVE. Os experimentos foram iniciados apenas após a aprovação ética do Comitê Institucional de Ética em Investigação Animal – CEUA – da UFC (protocolo 8727251021).

#### **4.2 Preparação da Solução de Troxerrutina**

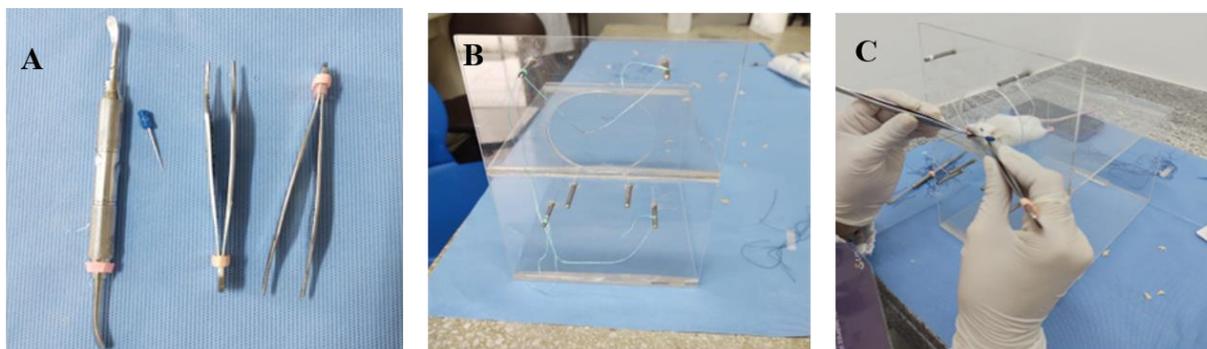
O Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) forneceu a Troxerrutina; os outros reagentes utilizados eram padrões analíticos. A Troxerrutina utilizada foi obtida da Xi'na Quanao Biotech Co. Lta (Xi'na, China) e tem uma massa molar de 742,6752 g/mol-1. A água destilada foi obtida utilizando um destilador de água Pilsen modelo 106.

A solução reserva foi preparada utilizando um balão volumétrico de 50 ml para o grupo de 150mg/kg para desenvolver a solução oral. Esta solução continha 1,125mg de Troxerrutina, diluída em solução salina (22,5mg/ml). Duas diluições adicionais foram preparadas a partir da solução mãe. Para o grupo de 100 mg/kg, foram transferidos 16,7 ml da solução mãe para um balão volumétrico de 25 ml. Para o grupo de 50 mg/kg, grupo,4 ml da solução de reserva foram transferidos para um balão volumétrico de 25 ml. E seguida, o volume foi completado com solução salina. Em todas as preparações, uma gota de surfactante Tween 80 foi adicionado.

#### **4.3 Protocolo Experimental da Periodontite Induzida por Ligadura**

A periodontite foi induzida a partir da inserção bilateral de um fio de algodão 4-0 ao redor dos primeiros molares inferiores em animais anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de 100 mg/kg de Ketamina (Dopalen, Ceva; Paulínia, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de Xilazina (Anasedan, Ceva; Paulínia, São Paulo, Brasil). Os animais foram colocados em decúbito ventral, em uma mesa de acrílico específica para roedores (Figura 4B). Para facilitar a abertura da boca dos animais, fios de seda foram amarrados aos seus dentes incisivos, servindo como auxílio nesse processo (Figura 4C). Para induzir espaço entre o primeiro e o segundo molar, uma ligadura foi cuidadosamente posicionada no sulco gengival dos primeiros molares. Utilizando pinças dente de rato, espátula número 7 e espaçadores endodônticos digitais tipo C, criou-se o espaço necessário (Figura 4A). O nó da ligadura foi estrategicamente mantido na região mesial dos primeiros molares, assegurando a eficácia do procedimento. A eutanásia dos animais foi realizada através de exsanguinação, procedimento feito sob efeito de anestesia, 11 dias após a indução da periodontite. Esse período foi escolhido por corresponder ao pico de

reabsorção óssea alveolar observado no modelo de estudo (AUNG et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019).



**Figura 4 – Material utilizado durante o procedimento de indução da periodontite por ligadura. A)** Espátula 7, espaçador digital C, pinças dente de rato; **B)** Mesa de acrílico para roedores com espaçadores de fios de seda; **C)** Animal posicionado na mesa de acrílico no momento da indução da periodontite.

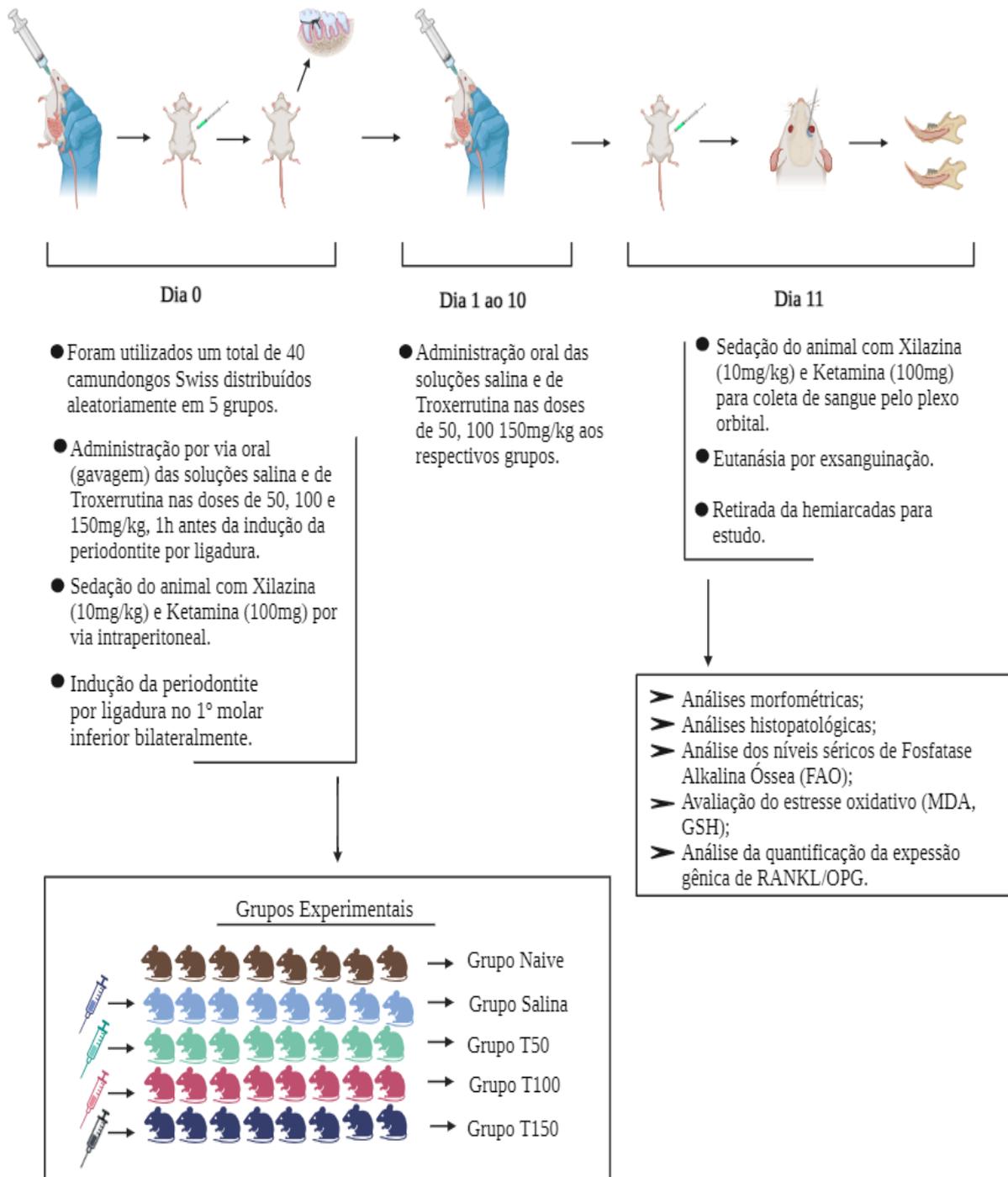
#### 4.4 Grupos Experimentais e Administração por Via Oral da Troxerrutina

Para esse estudo, os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos distintos, composto por oito animais cada grupo. Dois grupos controles foram estabelecidos: um submetido ao procedimento cirúrgico, recebendo apenas solução salina (grupo Salina), e outro grupo representando animais saudáveis (grupo Naive). Os três grupos experimentais receberam a solução de Troxerrutina nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg (grupos T50, T100 e T150, respectivamente), conforme ilustra o Quadro 1. As doses escolhidas para esse trabalho foram baseadas em estudos prévios do nosso grupo e descritas por DE MIRANDA et al., 2020. As soluções foram administradas usando uma cânula de gavagem adequada ao tamanho do animal, iniciando-se 1 hora antes da colocação da ligadura e continuando diariamente até o décimo dia. (LEITÃO et al., 2005). A figura 5 ilustra o protocolo experimental.

Grupo Naive	Animais não submetidos à ligadura
Grupo Salina	Animais submetidos à ligadura e que receberam solução salina
Grupo T50	Animais submetidos à ligadura e que receberam solução contendo Troxerrutina na dose de 50mg/kg
Grupo T100	Animais submetidos à ligadura e que receberam solução contendo Troxerrutina na dose de 100mg/kg

Grupo T150	Animais submetidos à ligadura e que receberam solução contendo Troxerrutina na dose de 150mg/kg
------------	---

**Quadro 1:** Distribuição dos grupos experimentais e grupos controles.



**Figura 5** – Os animais foram divididos em cinco grupos de forma aleatória. No dia 0, administramos a solução salina ao grupo dos animais com periodontite induzida e a solução com Troxerrutina nas doses de 50, 100 e 150mg/kg aos outros respectivos grupos de animais. O grupo Naive não recebeu a indução da periodontite e nenhuma solução. Do dia 1 ao dia 10, os animais receberam as soluções devidas aos seus respectivos grupos

e sempre no mesmo horário (14h). No dia 11 os animais foram eutanasiados por exsanguinação através do plexo orbital para a coleta de sangue e suas hemiarcadas inferiores foram removidas. Todo o material coletado foi levado para análises.

#### 4.5 Análise Morfométrica e Macroscópica do Osso Alveolar

Onze dias após a aplicação da ligadura, os animais foram eutanasiados, seguidos pela excisão e separação das mandíbulas, que então foram fixadas em formol a 10% tamponado. Após um período de 24 horas, para diferenciar osso de dente, as mandíbulas foram dissecadas, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e coradas com azul de metileno a 1%. Em seguida, as amostras foram fixadas em cera vermelha para facilitar a obtenção de imagens, (LIMA et al., 2020, e MARTINS et al., 2016). O software ImageJ 1.32j foi utilizado para o cálculo da perda óssea alveolar. Esse processo envolveu o cálculo da área (em mm<sup>2</sup>) das raízes expostas dos molares, subtraindo-a da área correspondente ao grupo controle. Todas as imagens foram comparadas utilizando-se uma área padrão de referência de 1,0 x 1,0 mm<sup>2</sup> (KUHR et al., 2004).

#### 4.6 Análise Histopatológica

Para análise histopatológica, as mandíbulas foram removidas, inicialmente fixadas em formalina neutra tamponada a 10% e, posteriormente, desmineralizadas em ácido fórmico a 10% (DE SOUSA et al., 2015). Seguindo a preparação, as amostras foram processadas para inclusão em parafina. As amostras foram seccionadas em fatias de 4µm, em plano mesiodistal ao longo dos molares para posterior coloração com hematoxilina e eosina. Três secções de cada amostra, localizadas entre o primeiro e o segundo molar, foram examinadas sob microscopia. A análise foi realizada utilizando um sistema de pontuação que varia de 0 a 3, baseado em parâmetros inflamatórios cujos escores foram estabelecidos e publicados anteriormente pelo grupo de pesquisa (LEITÃO et al., 2005; LIMA et al., 2000). A análise foi conduzida de forma cega, onde o avaliador desconhecia a identidade das amostras avaliadas, garantindo assim a imparcialidade na avaliação dos parâmetros. Os escores estão citados na tabela 2.

Escore: 0	Infiltrado celular ausente ou leve (infiltrado celular inflamatório limitado e restrito à região gengival marginal); Processo alveolar e cemento preservados.
-----------	---

Escore: 1	Infiltrado celular moderado (infiltrado celular inflamatório presente em toda a gengiva inserida); Processo alveolar com leve reabsorção e cimento intacto.
Escore: 2	Infiltrado celular acentuado (infiltrado celular inflamatório presente na gengiva e ligamento periodontal); Processo alveolar com degradação moderada e destruição parcial do cimento.
Escore: 3	Infiltrado celular acentuado; processo alveolar com reabsorção completa e destruição severa do cimento.

**Tabela 2:** Escores histopatológicos considerando o infiltrado celular inflamatório, a integridade do cimento e do osso alveolar (LEITÃO et al., 2005; LIMA et al., 2000).

#### 4.7 Análise da Fosfatase Alcalina (FAO)

Amostras de sangue foram coletadas dos camundongos pelo plexo retro orbital sob anestesia com Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal, imediatamente antes da eutanásia no 11º dia. Este procedimento teve como objetivo determinar a concentração plasmática de fosfatase alcalina utilizando o método de ativação térmica (WHITBY; MOSS, 1975). As amostras foram aquecidas a 56°C durante 10 minutos. A determinação dos níveis séricos de FAO (uma isoforma termossensível da fosfatase alcalina total, FAT) foi realizada pela subtração da concentração da fosfatase alcalina aquecida no soro da concentração de FAT no soro. A execução da análise seguiu rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante (Labest1, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram apresentados como a variação da Fosfatase Alcalina Óssea no dia 11, expressos em Unidades por Litro (U/L).

#### 4.8 Análise dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

O tecido gengival correspondente aos molares inferiores foi coletado para avaliar o impacto das soluções de Troxerrutina no estresse oxidativo. Essa avaliação envolveu a quantificação de marcadores de estresse oxidativo, especificamente a glutathiona reduzida (GSH) e o malonaldeído (MDA), este último um indicativo de peroxidação lipídica. Para medir a produção de MDA, utilizou-se a reação do ácido tiobarbitúrico (UCHIYAMA; MIHARA, 1978). Na prática, 250µl de homogenato de tecido gengival a 10% foram misturados com 1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 1% e com 0,5 ml de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. A mistura foi agitada em banho-maria por 45 minutos. Após o processo de resfriamento, foram

adicionados 2 ml de n-butanol, seguido de homogeneização. A camada de butanol foi então separada, e as concentrações de MDA foram determinadas medindo-se a absorbância (535nm). Os resultados obtidos foram expressos em nanomol de MDA por grama de tecido gengival, proporcionando uma medida quantitativa do estresse oxidativo induzido no tecido.

#### **4.9 Análise dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Para determinar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido gengival, as amostras foram inicialmente homogeneizadas em 400µl de uma solução a 10% em peso, preparada em EDTA 0,02 M. Em seguida, foram adicionados 320µl de água destilada e 80µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% à homogeneização, procedendo-se com a centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante coletado (400µL) foi misturado com 800µL de tampão Tris 0,4 M ajustado para pH 8,9 e 20µL de DTNB 0,01 M. A absorbância foi medida em cada amostra a 412nm, permitindo a quantificação dos níveis de GSH, que foram expressos em µg de GSH por miligrama de tecido (AKERBOOM; SIES, 1981).

#### **4.10 Análise Quantitativa da Expressão Gênica de RANKL E OPG**

Para isolar o RNA total das amostras de osso, foi empregado o reagente TRIzol (Life Technologies) seguindo-se com a utilização do reagente SYBR Green (Life Technologies) para a execução da qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real). Esta análise foi realizada no sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem – StepOne). As experiências foram conduzidas em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados. Os níveis de expressão relativa de RANKL e OPG foram calculados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001a). A expressão de RNAm para RANK-L e OPG foi também determinada por qPCR. Conforme as instruções do fabricante, o RNA foi extraído de amostras de tecido ósseo previamente macerado com nitrogênio líquido utilizando o Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad, CA, EUA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada pela razão de absorbância 260/280, e a quantificação foi realizada por meio de absorção de UV utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Um micrograma de RNA total das amostras de osso em um volume final de 20 µl foi transcrito reversamente em cDNA no sistema C1000 Touch™ Thermal Cycler com o kit de síntese de cDNA iScript™ da Bio-Rad. A análise de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) do mRNA foi conduzida utilizando o sistema de detecção CFX96 Touch™ da Bio-Rad, usando

o iQTM SYBR1 Green Supermix (Bio-Rad, CA, EUA), conforme indicado pelo fabricante. A qPCR foi executada por um total de 35 ciclos, obedecendo a condições específicas estabelecidas para o procedimento: desnaturação 95°C, 30 s; recozimento 60°C, 30 s; extensão 25°C, 50 s. Todas as amostras foram executadas em duplicata, e a expressão relativa do mRNA foi determinada após a normalização com os valores de expressão da GAPDH. A integridade do DNA de cadeia dupla foi avaliada através da análise da curva de fusão durante o aquecimento (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A tabela 3 apresenta as sequências dos primers utilizados neste estudo.

<b>Sequência dos Primers</b>	
GAPDH	5'- GGGCTGCCTTCTCTTGTGAC/CCGTTGATGACCAGCTTCCC - 3'
RANKL	5'- TGAGCTATGGAAGGGGGTCA/GTCCCAGCGCAATGTAACAA - 3'
OPG	5' - GAGACGCACCTAGCACTGAC/AAGGGTTTCCTGGGTTGTCC - 3'

**Tabela 3-** Sequência de oligonucleotídeos dos primers usados no ensaio de qPCR

#### **4.11 Análise Estatística**

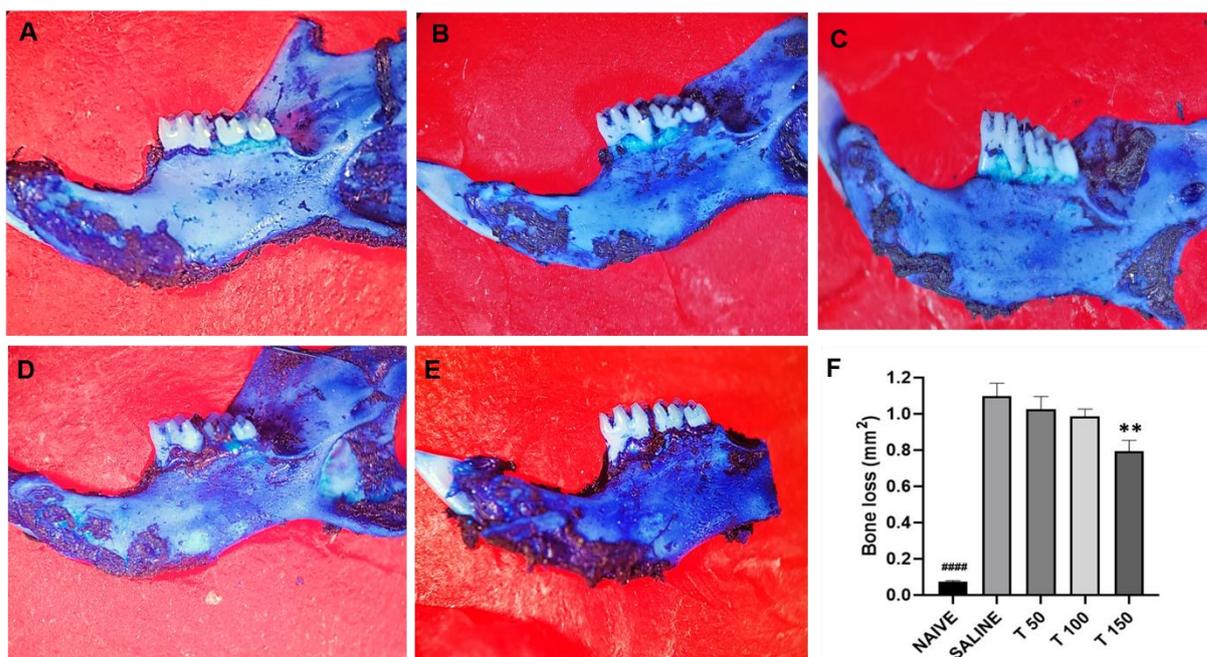
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EPM) ou mediana, conforme apropriado. Para os escores histopatológicos optou-se pela apresentação em mediana, acompanhada da variação entre os valores mínimo e máximo. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados paramétricos, aplicou-se o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, enquanto para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Considerou-se um nível de significância estatístico para valores de  $P < 0,05$ . Todas as análises foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism® 8.0 (Chicago, CA, EUA).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Aspectos Macroscópicos**

A Figura 6A exibe os aspectos macroscópicos da mandíbula do grupo naive, evidenciando a preservação do osso alveolar em contraste com a mandíbula do grupo não

tratado, salina, que apresenta severa reabsorção óssea com exposição da raiz (Fig. 6B). O tratamento com Troxerrutina na dose de 150 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a perda óssea induzida pela periodontite, em comparação com o grupo salina (Fig. 6F). As Figuras 6C e 6D mostram a aparência macroscópica do periodonto nos grupos submetidos à periodontite e tratados com Troxerrutina nas doses de 50mg/kg e 100mg/kg, respectivamente, onde ainda se observa perda óssea com exposição da raiz.

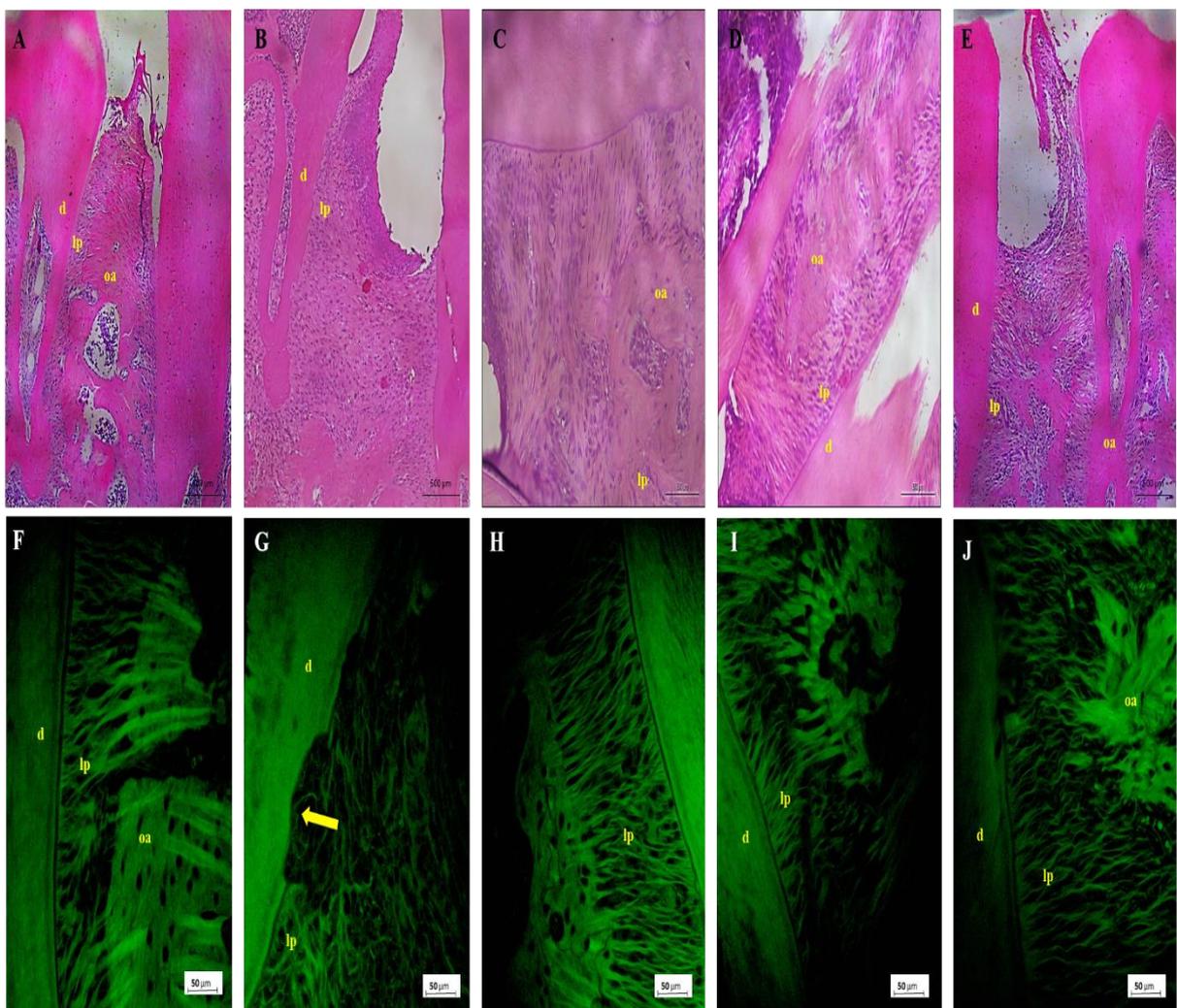


**Figura 6 – Aspectos macroscópicos e índice de perda óssea alveolar. A) Naive; B) Salina; C) T50 (50mg/kg); D) T100 (100mg/kg); E) T150 (150mg/kg).** Analisamos os aspectos macroscópicos da área de perda óssea pela mensuração da área de reabsorção óssea. Utilizamos o software ImageJ para medir a perda óssea das amostras e fizemos a análise estatística com o software GraphPad Prism 8. \*\*P=0,0041 vs. salina; ####P<0,0001 vs. Naive. Teste ANOVA/Tukey.

## 5.2 Avaliação Histopatológica

A análise histopatológica corroborou os dados macroscópicos ao evidenciar que o posicionamento da ligadura induziu, de fato, promoveu uma perda óssea significativa após 11 dias, em comparação ao grupo naive. A análise histopatológica do grupo naive revelou características normais do periodonto, incluindo a integridade do osso alveolar, do cemento e do ligamento periodontal (Fig. 7A e 7F), recebendo mediana de escores 0, com variação 0-0 (Tabela 4). Em contraste, no grupo tratado com solução salina, observou-se, além da perda óssea, reabsorção de cemento e dentina e presença de infiltrado inflamatório (Fig. 7B e 7G), apresentando mediana de escores 3, variação 2-3. O tratamento com Troxerrutina (150 mg/kg) em animais submetidos a 11 dias de periodontite induzida por ligadura resultou em uma redução

significativa da perda óssea alveolar (Fig. 7E e 7J), com escores 2(0-2), apresentando significância estatística ( $P < 0,05$ ) quando comparado aos animais não tratados e submetidos à mesma condição experimental (Tabela 4). As análises histopatológicas realizadas nos grupos tratados com Troxerrutina nas doses de 50 mg/kg (Fig. 7C e 7H) e 100 mg/kg (Fig. 7D e 7I) não demonstraram diferenças estatísticas significativas nos escores histológicos desses grupos em comparação ao grupo tratado com solução salina. Isso indica que essas doses de Troxerrutina não foram eficazes para proteger o periodonto contra os efeitos deletérios da periodontite induzida. (Tabela 4).



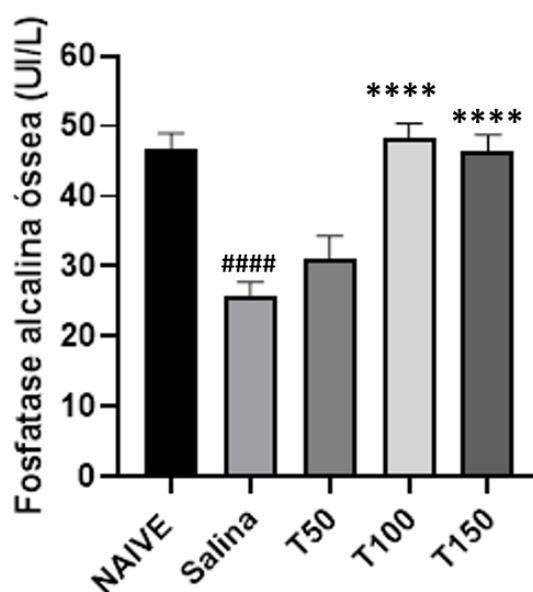
**Figura 7 - Análise histopatológica das lâminas coradas com HE.** As pontuações histopatológicas foram avaliadas por investigação cega. Coloração HE - Microscópio com aumento de 500X. c - cimento, d - dentina, lp - ligamento periodontal, oa - osso alveolar. Seta amarela - reabsorção do cimento. As imagens A, B, C, D e E com ampliação de 400x foram fotografadas em microscópio de luz. As imagens F, G, H, I e J foram fotografadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 50x. Naive (A e F), Salina (B e G), Troxerrutina 50mg/kg (C e H), Troxerrutina 100mg/kg (D e I), Troxerrutina 150mg/kg (E e J).

Grupos Experimentais				
Naive	Salina	T50	T100	T150
0 (0-0)	3 (2-3) <sup>####</sup>	2 (2-3) <sup>##</sup>	2 (1-3)	2 (0-2) <sup>*</sup>

**Tabela 4. Alterações histopatológicas das hemiarcadas dos camundongos.** A gradação analisada levou em consideração os seguintes escores. Escore 0: Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado. Escore 1: Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado. Escore 2: Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento. Escore 3: Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento. Os valores foram expressos como mediana, mínimo e máximo, onde <sup>####</sup>P<0,0001 e <sup>##</sup>P=0,023 vs. Naive e <sup>\*</sup>P=0,0465 vs. Salina. Não houve diferença estatística entre os grupos T100 e T150 com relação ao grupo Naive. Os dados foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's.

### 5.3 Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

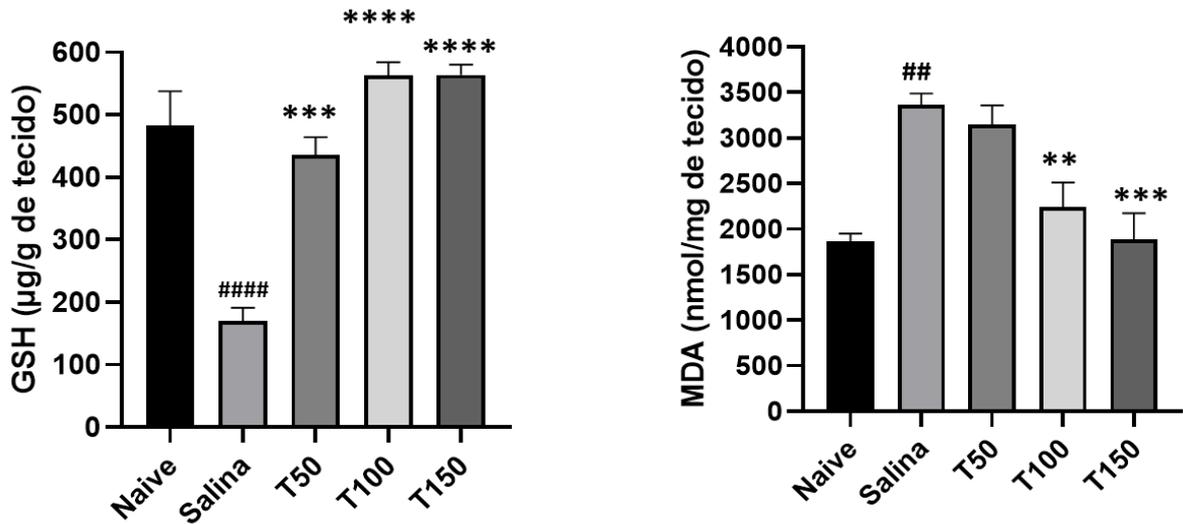
Animais submetidos ao modelo de periodontite induzida e tratados com solução salina (grupo Salina) mostraram uma redução significativa nos níveis séricos de FAO em comparação com o grupo Naive. O tratamento com Troxerrutina nas doses de 100mg/kg e 150mg/kg resultou em aumento estatisticamente significativo na concentração sérica de FAO quando comparado ao grupo Salina, indicando uma maior atividade osteoblástica nesses grupos. (Fig. 8)



**Figura 8 - Análise da atividade osteoblástica.** O grupo Naive, em comparação com os outros grupos, foi estatisticamente significativo. <sup>####</sup>p<0,0001 vs. Naive; <sup>\*\*\*\*</sup>p<0,0001 vs. Salina; por ANOVA/Tukey.

#### 5.4 Concentração de Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH)

Animais submetidos ao modelo de periodontite induzida por ligadura e tratados com solução salina (grupo salina) apresentaram um aumento significativo nas concentrações de malonaldeído (MDA) e uma redução significativa nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em comparação ao grupo Naive, indicando um aumento do estresse oxidativo induzido pela doença. O tratamento com Troxerrutina, em todas as doses avaliadas, resultou em diferenças estatísticas significativas na concentração gengival de GSH em relação ao grupo salina, evidenciando concentrações maiores desse antioxidante endógeno em comparação ao grupo salina. No que tange às concentrações gengivais de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, o tratamento com Troxerrutina nas doses de 100mg/kg e 150mg/kg, mas não na dose de 50mg/kg, resultou em uma diminuição significativa nos níveis gengivais de MDA em comparação ao grupo salina. Esses resultados sugerem um potencial efeito antioxidante da Troxerrutina (Figura 09).

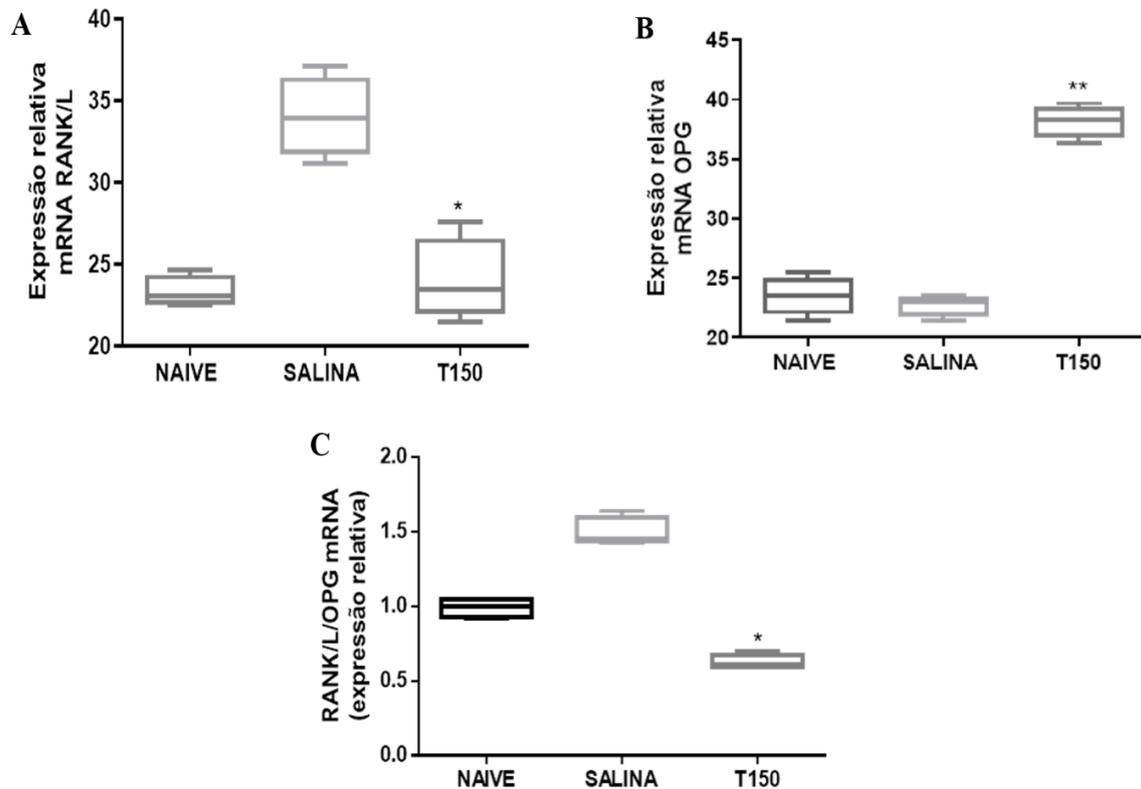


**Figura 9 – Marcadores de Estresse Oxidativo.** Quantificação dos níveis de GSH e MDA no tecido gengival dos camundongos. GSH: ##### $p < 0,0001$  vs. grupo Naive, \*\*\* $p = 0,0001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. grupo Salina. MDA: ### $p < 0,0001$  vs. grupo Naive e \*\* $p = 0,0075$ , \*\*\* $p = 0,0005$  vs. grupo Salina; por ANOVA/Tukey.

#### 5.5 Expressão gênica de RANKL e OPG por qPCR

Animais submetidos ao modelo de periodontite induzida por ligadura e tratados com solução salina (grupo salina) exibiram um aumento significativo na expressão gênica do RANKL (Fig. 10A), acompanhado de uma diminuição na expressão gênica do OPG ( $P < 0,05$ ) (Fig. 10B), em comparação ao grupo Naive. O tratamento com Troxerrutina na dose de 150mg/kg conduziu a diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica tanto de

OPG quanto de RANKL em relação ao grupo salina, revelando um perfil de menor atividade osteoclástica neste grupo. Os animais tratados com esta dose de Troxerrutina mostraram uma redução significativa na expressão gênica do RANKL e um aumento na expressão gênica do OPG ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo salina, conforme ilustra a Fig. 10.



**Figura 10 – Expressão gênica de RANKL (A) e OPG (B) pela técnica de biologia molecular.** Por razões didáticas, optamos por representar apenas a solução de Troxerrutina na dose de 150mg/kg (T150), uma vez que essa dose demonstrou ser a mais eficaz nos ensaios anteriores. O gráfico C exibe a razão entre a expressão relativa de RANKL (Receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante)/OPG (osteoprotegerina), fornecendo uma representação visual da relação entre esses dois marcadores importantes no metabolismo ósseo. Foi utilizado ANOVA com pós teste Mann-Whitney para estes dados, considerando valor de  $p < 0,005$  (T150 vs. Grupo Salina) para a expressão do gene RANKL e OPG.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos osteoprotetores e antioxidantes da administração oral de Troxerrutina na periodontite induzida por ligadura em camundongos. A administração oral desta substância resultou em benefícios significativos para a preservação do osso alveolar, evidenciado pela menor perda óssea e pela redução do infiltrado inflamatório. Esses resultados apontam para um potencial terapêutico da Troxerrutina contra perda óssea de natureza inflamatória. Esse potencial é reforçado pelo aumento significativo nas concentrações séricas de fosfatase alcalina óssea nos animais que receberam a maior dose de Troxerrutina em

comparação ao grupo controle sem tratamento, o que aponta para uma maior atividade osteoblástica. A intervenção também teve um impacto significativo na expressão gênica de marcadores de metabolismo ósseo, reduzindo a expressão de RANKL e elevando a de OPG, o que sugere um cenário propício para a formação óssea. Adicionalmente, o tratamento favoreceu um equilíbrio redox positivo, demonstrado pela diminuição das concentrações do marcador de peroxidação lipídica (MDA) e pelo aumento do marcador antioxidante endógeno (GSH).

O modelo experimental adotado neste estudo provou ser eficaz na replicação dos principais aspectos da periodontite observados em humanos, estabelecendo uma base sólida para a investigação. A periodontite, uma doença imuno-inflamatória, compromete os tecidos de suporte dos dentes. É causada por um biofilme oral disbiótico e evolui com a destruição progressiva do periodonto, levando à formação de bolsas periodontais, recessão gengival, perda do osso alveolar e, eventualmente, dos dentes; além disso, tem também repercussões sistêmicas significativas (NOBLE; PAPAPANOU, 2023).

Embora existam tratamentos reconhecidos para a periodontite, a necessidade de identificar terapias complementares é imperativa. As práticas de higiene oral e a eliminação de fatores que favorecem a retenção de placa bacteriana frequentemente não são suficientes para controlar a doença de forma eficaz. Procedimentos adicionais, como raspagem supra e subgengival, o alisamento radicular e o polimento coronário, são essenciais para o manejo adequado da periodontite (SCHUSSLER; PICOLI; DIAS, 2024). Além disso, embora o uso de antibióticos e anti-inflamatórios seja uma prática comum, as limitações impostas pelo uso prolongado e pelos potenciais efeitos colaterais desses medicamentos evidenciam a necessidade de cautela no uso desses fármacos. O presente trabalho destaca a relevância de investigar e desenvolver novas abordagens terapêuticas que possam complementar ou superar as técnicas tradicionais, considerando especialmente as diversas facetas e o impacto sistêmico da periodontite.

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na medicina há séculos, sendo amplamente utilizados para diversos fins terapêuticos (SANTOS; ANDRADE, 2022). Até o momento, a literatura científica carece de estudos que investiguem a aplicabilidade da Troxerrutina no tratamento da periodontite. Nesse sentido, nosso trabalho se destaca como uma iniciativa pioneira, explorando o uso da Troxerrutina em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura. A pesquisa focou na avaliação dos efeitos da Troxerrutina, particularmente suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

A escolha pela administração oral no presente trabalho não apenas aproveita as diversas vantagens dessa via de administração, mas também favorece significativamente a

translacionalidade clínica da pesquisa. De fato, a administração oral de medicamentos apresenta várias vantagens em comparação com outras vias de administração, tornando-a uma escolha popular tanto para profissionais de saúde quanto para pacientes. Primeiramente, destaca-se pela sua conveniência e facilidade de uso, permitindo a autoadministração sem necessidade de assistência médica especializada, o que a torna ideal para tratamentos domiciliares. Além disso, é geralmente mais confortável para o paciente, evitando o desconforto e os riscos de infecção associados a injeções e procedimentos invasivos. A absorção gradual dos medicamentos pelo trato gastrointestinal contribui para a manutenção de níveis estáveis do medicamento no sangue, proporcionando efeitos terapêuticos consistentes. A via oral também oferece versatilidade de formulações, incluindo comprimidos, cápsulas, líquidos e suspensões, adaptando-se às necessidades e preferências dos pacientes. Adicionalmente, a absorção mais lenta minimiza o risco de sobredosagem rápida e efeitos adversos graves. Por fim, a administração oral pode ser mais econômica, evitando custos adicionais com dispositivos especiais ou procedimentos profissionais. Essas características tornam a administração oral uma opção atraente para a entrega de terapias medicamentosas, especialmente para tratamentos prolongados e de manutenção, como é o caso do tratamento da periodontite. Concluindo, a escolha pela administração oral no presente trabalho não apenas aproveita as diversas vantagens dessa via de administração, mas também favorece significativamente a translacionalidade clínica da pesquisa.

Embora a literatura ainda não apresente estudos sobre o impacto da Troxerrutina na periodontite, pesquisas envolvendo a quercetina em modelos experimentais dessa doença têm reportado resultados encorajadores, com redução da reabsorção óssea em ratos e camundongos (NAPIMOGA et al., 2013; TASKAN; GEVREK, 2020). O trabalho de NAPIMOGA et al., 2013 se mostra particularmente significativo ao demonstrar que a administração subcutânea de quercetina, na dose de 150mg/kg, conseguiu inibir a reabsorção óssea inflamatória em um modelo de periodontite induzida por ligadura, reforçando os nossos achados. Ademais, a Troxerrutina foi eficaz em estimular a formação óssea e acelerar o processo de reparo de fratura de fêmur em ratos (YANG et al., 2021).

Nossas análises histopatológicas confirmam a preservação do osso alveolar, do cemento e da dentina e a redução do infiltrado inflamatório do tecido periodontal no grupo tratado com a maior dose da Troxerrutina, em comparação com o grupo não tratado. Em conjunto, os dados macroscópicos e microscópicos de nosso estudo sugerem uma osteoproteção importante conferida pela administração de Troxerrutina. Esse efeito pode estar relacionado a um aumento significativo na atividade osteoblástica associada à uma redução na atividade

osteoclástica. De fato, observamos uma elevação significativa na atividade da fosfatase alcalina óssea (FAO) no grupo que recebeu Troxerrutina de 150 mg/kg, indicando uma potencialização da função osteoblástica nesse grupo em relação ao grupo não tratado (salina). Além disso, a diminuição significativa na razão RANKL/OPG, em comparação com o grupo controle não tratado, reforça a evidência de uma menor atividade osteoclástica no grupo tratado com Troxerrutina.

A fosfatase alcalina é comumente utilizada para avaliar o metabolismo ósseo, indicando a formação óssea e a atividade osteoblástica. Esta enzima desempenha um papel importante na compreensão e monitorização dos processos dinâmicos do tecido ósseo, o que a torna uma ferramenta valiosa para a investigação de aspectos relacionados com a saúde óssea e a progressão da periodontite (VAN STRAALLEN et al., 1991; SARDIWAL et al., 2013b). A observação de uma diminuição na atividade da FAO em modelos experimentais de periodontite, documentada por Menezes et al. (2012), reforça a pertinência de empregar este marcador na avaliação do metabolismo ósseo no âmbito do nosso estudo. Tal achado reforça a significância da FAO não apenas como um indicador das modificações no metabolismo ósseo decorrentes da periodontite experimental, mas também como uma ferramenta valiosa na avaliação da efetividade dos tratamentos propostos.

Nossos dados sugerem ainda uma diminuição da atividade osteoclastogênica, uma vez que a razão RANKL/OPG apresentou-se significativamente menor no grupo tratado com a maior concentração de Troxerrutina comparado ao grupo controle sem tratamento. Esse resultado aponta para maiores concentrações de OPG em relação à RANKL no grupo Troxerrutina. Esse achado está em consonância com os achados de NAPIMOGA et al., 2013, onde a quercetina foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* através da regulação negativa de RANKL.

O sistema RANK/RANKL/OPG desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo ósseo, atuando diretamente no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Esse sistema complexo inclui o receptor RANK, encontrado na superfície dos osteoclastos e suas células precursoras, o seu ligante (RANKL), uma proteína expressa principalmente pelos osteoblastos e algumas células do sistema imunológico, e a osteoprotegerina (OPG), que atua como um receptor para o RANKL. A interação entre RANK e RANKL é essencial para a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, resultando em maior reabsorção óssea. A OPG, por outro lado, se liga ao RANKL, impedindo sua interação com o RANK e, conseqüentemente, a ativação dos osteoclastos. Este mecanismo de ação da OPG resulta na inibição da reabsorção óssea.

Portanto, níveis elevados de OPG no tecido ósseo de animais tratados com a Troxerrutina no presente estudo estão associados a uma menor perda óssea. Não podemos afirmar, no entanto, se a Troxerrutina apresenta um efeito direto na modulação da via RANK/RANKL/OPG ou se a modulação da via no presente estudo foi secundária aos efeitos antiinflamatórios e antioxidantes da Troxerrutina. De fato, a remodelação óssea é coordenada pelos osteoclastos e osteoblastos e regulada por hormônios e substâncias produzidas pelos osteócitos em resposta a estímulos mecânicos e micro lesões (ERIKSEN, 2010). A literatura relata que a reabsorção óssea alveolar, associada à periodontite, pode ser desencadeada direta e indiretamente pela infiltração de células inflamatórias e geração de estresse oxidativo (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). A periodontite é uma doença que resulta de múltiplos desequilíbrios nas vias vitais do organismo. É essencial restaurar a homeostase e coordenar os esforços para resolver a inflamação para evitar quaisquer efeitos nocivos no tecido ósseo. Estudos relatam que os flavonoides podem ser uma ferramenta poderosa na prevenção de doenças inflamatórias, ao aumentar a imunidade local e a defesa do hospedeiro (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; ZHANG et al., 2010).

Em nosso estudo, a indução experimental de periodontite levou a um aumento significativo tanto nos escores histopatológicos baseados em achados inflamatórios quanto nos marcadores de estresse oxidativo. A administração de Troxerrutina demonstrou uma capacidade significativa de reduzir esses achados. Notadamente, o tratamento com Troxerrutina promoveu um aumento expressivo nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento, sugerindo um reforço no sistema antioxidante. Além disso, a administração de Troxerrutina resultou em uma diminuição significativa nas concentrações de malondialdeído (MDA) no tecido gengival nos animais tratados com as doses mais altas (100 e 150 mg/kg). Essas observações corroboram evidências prévias na literatura sobre o potencial antioxidante dos flavonoides, reforçando a relevância da Troxerrutina como agente terapêutico na atenuação dos danos associados ao estresse oxidativo na periodontite (IOVA et al., 2021). Outros trabalhos que investigaram o uso de fitoquímicos no contexto da periodontite induzida também encontraram propriedades antioxidantes desses compostos naturais, incluindo a curcumina e rutina (TEIXEIRA et al., et al., 2017b, e de IOVA et al., 2021.), reforçando a crescente evidência do potencial de agentes naturais no tratamento da periodontite. A atividade antioxidante da Troxerrutina foi demonstrada no trabalho de FARAJDOKHT e colaboradores (2017), que reportaram que esse composto foi capaz de proteger os neurônios do hipocampo contra o estresse oxidativo e a apoptose induzidos pela proteína beta-amiloide em ratos Wistar.

Os resultados apresentados no presente estudo destacam o potencial terapêutico da Troxerrutina contra os efeitos deletérios da periodontite experimental. Esses achados reforçam o papel dos flavonoides, especificamente da Troxerrutina, como agentes capazes de conferir proteção antioxidante, contribuindo para a saúde periodontal. Esse composto emerge, portanto, como um candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento e prevenção da periodontite, necessitando, no entanto, de estudos adicionais para a elucidação completa de seus mecanismos de ação e para a avaliação de sua eficácia e segurança em aplicações clínicas.

O potencial uso clínico da Troxerrutina pode ter um impacto significativo na qualidade de vida das pessoas, ao proporcionar uma opção de tratamento eficaz para a periodontite, uma condição que afeta uma grande parcela da população e está diretamente relacionada a complicações sistêmicas. A integração dessa substância às estratégias de tratamento existentes pode oferecer benefícios substanciais não só aos indivíduos afetados, mas também ao sistema unificado de saúde brasileiro, ao reduzir a necessidade de intervenções mais invasivas e onerosas.

## **7. CONCLUSÃO**

O presente estudo mostrou que a Troxerrutina pode reduzir os efeitos nocivos da periodontite induzida por ligaduras na mandíbula de camundongos. A administração de Troxerrutina, por via oral, pode aumentar a osteoproteção e prevenir a reabsorção óssea inflamatória na periodontite, o que indica o seu potencial terapêutico significativo nos tecidos periodontais. Este estudo é o primeiro a demonstrar o efeito antirreabsortivo da Troxerrutina num modelo de periodontite induzido por ligadura, o que pode ser devido, pelo menos em parte, às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

## REFERÊNCIAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 394, n. 2, p. 49–54, ago. 2013.
- AKERBOOM, T. P. M.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 373–382, 1981.
- AKINCIBAY, H.; ŞENEL, S.; AY, Z. Y. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80, n. 2, p. 290–296, 9 jun. 2006.
- AUNG, K. T. et al. Aging-affected msc functions and severity of periodontal tissue destruction in a ligature-induced mouse periodontitis model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–20, 1 nov. 2020.
- AZIZ, Z. et al. A systematic review of the efficacy and tolerability of hydroxyethylrutosides for improvement of the signs and symptoms of chronic venous insufficiency. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 177–185, 1 abr. 2015.
- BABRI, S. et al. Effect of troxerutin on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus neurons in a  $\beta$ -amyloid model of Alzheimer's disease: An electrophysiological study. **European Journal of Pharmacology**, v. 732, n. 1, p. 19–25, 5 jun. 2014.
- BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 3, p. 239–248, 24 set. 2012.
- BHATIA, M. et al. Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumin. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. ZC65–ZC69, 1 dez. 2014.
- BIANCHI, M. et al. Troxerutin, a mixture of O-hydroxyethyl derivatives of the natural flavonoid rutin: Chemical stability and analytical aspects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 248–257, 20 fev. 2018.
- BLUMER, M. J. F. Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. **Annals of Anatomy**, v. 235, 1 maio 2021.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, 29 jun. 2007.
- CHI, L. et al. Porphyromonas gingivalis-induced cognitive impairment is associated with gut dysbiosis, neuroinflammation, and glymphatic dysfunction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 1 dez. 2021.
- CHOI, Y. et al. Oral dysbiosis in severe forms of periodontitis is associated with gut dysbiosis and correlated with salivary inflammatory mediators: a preliminary study. **Frontiers of Oral Health**, v. 2, 2021.
- CORTEZ, G. F. P. et al. Razões e consequências das perdas dentárias em adultos e idosos no Brasil: metassíntese qualitativa. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 28, n. 5, p. 1413–1424, 1 maio 2023.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

- DE MIRANDA, J. A. L. et al. Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: role of cyclooxygenase-2 pathway. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 10, p. 1–21, 8 jan. 2020.
- DE SOUSA, A. M. et al. Evaluation of different methods of decalcification in routine staining, histochemical staining, and immunohistochemical assay of bone. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 2, p. e100, ago. 2015.
- ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, dez. 2010.
- FARAJDOKHT, F. et al. Troxerutin protects hippocampal neurons against amyloid beta-induced oxidative stress and apoptosis. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1081–1089, 9 ago. 2017.
- FERES, M. et al. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. **Periodontology 2000**, v. 72, n. 1, p. 30–53, 1 out. 2016.
- GATEJ, S. M. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. 2, p. 204–212, 1 fev. 2018.
- GINALDI, L.; DE MARTINIS, M. Osteoimmunology and beyond. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 3754–3774, 2016.
- HIENZ, S. A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.
- IOVA, G. M. et al. The antioxidant effect of curcumin and rutin on oxidative stress biomarkers in experimentally induced periodontitis in hyperglycemic Wistar rats. **Molecules**, v. 26, n. 5, 2021.
- KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, p. 101–106, 5 set. 2004.
- LANG, N. P.; BARTOLD, P. M. Periodontal health. **Journal of Periodontology**, 1 jun. 2018.
- LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, p. 123–150, 2008.
- LEIRA, Y. et al. Is periodontal disease associated with Alzheimer's disease? A systematic review with Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 48, n. 1–2, p. 21–31, 1 jun. 2017.
- LEITÃO, R. F. C. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 6, p. 956–963, 1 jun. 2005.
- LIMA, H. G. DE; LARA, V. S. Aspectos imunológicos da doença periodontal inflamatória: participação dos mastócitos. **Unopar Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 225–229, 2013.
- LIMA, V. DE et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, n. 2, p. 123–129, jan. 2000.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

- LU, J. et al. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. **Brain**, v. 134, n. 3, p. 783–797, mar. 2011.
- MALINSKA, H. et al. Beneficial effects of troxerutin on metabolic disorders in non-obese model of metabolic syndrome. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2019.
- MARCELINO, W. M. DO N. et al. Edentulismo no Brasil: impactos na saúde da população idosa com foco na atenção primária à saúde. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 28771–28784, 20 nov. 2023.
- MARTINS, C. S. et al. Topical HPMC/S-nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–19, 16 abr. 2016.
- MARZIN, D. et al. Study of mutagenic activity of troxerutin, a flavonoid derivative. **Toxicology Letters**, v. 35, p. 297–305, 17 out. 1987.
- NAPIMOGA, M. H. et al. Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2316–2321, 27 dez. 2013.
- NAZIR, M. et al. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. **Scientific World Journal**, v. 2020, 2020.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 2, p. 72–80, abr. 2017.
- NICO, L. S. et al. Saúde bucal autorreferida da população adulta brasileira: resultados da pesquisa nacional de saúde 2013. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 389–398, 1 fev. 2016.
- NOBLE, J. M.; PAPAPANOU, P. N. With teeth, broken, or fixed: the challenges of linking periodontitis, neuroepidemiology, and biomarkers of disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, p. 1–4, 26 maio 2023.
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. Aliskiren attenuates the inflammatory response and wound healing process in diabetic mice with periodontal disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 4 jul. 2019.
- PACIFICI, R. The immune system and bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, nov. 2010.
- PANAT, N. A. et al. Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. **Food Chemistry**, v. 194, p. 32–45, 5 ago. 2016.
- PIHLSTROM BRUCE; MICHALOWICZ S BRYAN; JOHNSON NEWALL W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, p. 1809–1820, 19 nov. 2005.
- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 13 ago. 2010.
- SANTI, G. N. et al. Aplicação das plantas nativas do cerrado para o desenvolvimento de fitocosméticos e preservação do bioma: uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 11, p. 29481–29496, 9 nov. 2023.

- SANTOS, I. DA C.; ANDRADE, L. G. DE. O papel dos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 3, p. 906–916, 31 mar. 2022.
- SARDIWAL, S. et al. Bone alkaline phosphatase in CKD-mineral bone disorder. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 62, n. 4, p. 810–822, 2013.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. A new and fast HPLC method for determination of rutin, troxerutin, diosmin and hesperidin in food supplements using fused-core column technology. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1353–1360, out. 2013.
- SCHUSSLER, E. C.; PICOLI, A. H.; DIAS, J. R. DA S. Diferentes métodos de motivação no tratamento periodontal – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 52–70, 3 jan. 2024.
- SHU, L. et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Pi3k/Akt pathway in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1939–1948, 1 jan. 2018.
- TANG, M. et al. Flavonoid extract from propolis alleviates periodontitis by boosting periodontium regeneration and inflammation resolution via regulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B and RANK/NF- $\kappa$ B pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 319, p. 117324, 30 jan. 2024.
- TASKAN, M. M.; GEVREK, F. Quercetin decreased alveolar bone loss and apoptosis in experimentally induced periodontitis model in Wistar rats. **Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry**, v. 19, n. 4, p. 436–448, 24 jan. 2020.
- TEIXEIRA, A. H. et al. *Stemodia maritima* L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. DEC, 1 dez. 2017.
- THEILL, L. E.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. RANK-L, and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 795–823, 2002.
- THIELE, S.; RAUNER, M.; GOES, P. Recent advances in periodontitis, a prototypic osteo-immunological disease. **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, v. 3, p. 1–10, 14 dez. 2018.
- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 271–278, 14 nov. 1978.
- VAN STRAALLEN, J. P. et al. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 201, n. 2, p. 27–33, 14 set. 1991.
- VICENTE OPPERMAN, R. An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. **Braz Oral Res**, v. 21, n. 1, p. 8–15, 2007.
- VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v. 754, 5 set. 2020.
- WEITZMANN, M. N. The role of inflammatory cytokines, the RANKL/OPG axis, and the immunoskeletal interface in physiological bone turnover and osteoporosis. **Scientifica**, v. 2013, p. 1–29, 24 dez. 2013.

WHITBY, L. G.; MOSS, D. W. Analysis of heat inactivation curves of alkaline isoenzymes in serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 59, p. 361–367, 24 mar. 1975.

XIAO, Y. M. et al. Regioselective enzymatic acylation of troxerutin in nonaqueous medium. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 1, p. 59–62, jan. 2010.

YANG, X. et al. Troxerutin stimulates Osteoblast differentiation of mesenchymal stem cell and facilitates bone fracture healing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1–10, 9 ago. 2021.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. What Is Oxidative Stress? **JMAJ**, v. 45, n. 7, 2002.

ZHANG, J. FANG et al. Flavonoids of Herba Epimedii regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 70–74, 15 jan. 2010.

## ANEXO I - APROVAÇÃO DO ESTUDO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais  
Acesso C  
ACESSE C

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO BIOATIVO - TROXERUTINA - NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM CAMUNDONGOS SWISS", protocolada sob o CEUA nº 8727251021 (ID 002309), sob a responsabilidade de **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** e equipe; *Conceição da Silva Martins Rebouças; Rafaela Franco Moreira; Gabriela Quariguase Damasceno* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 15/02/2022.

We certify that the proposal "ORAL MANAGEMENT EFFECT OF THE BIOACTIVE - TROXERUTIN - ON INDUCED PERIODONTAL DISEASE IN SWISS MICE.", utilizing 40 Heterogenics mice (40 males), protocol number CEUA 8727251021 (ID 002309), under the responsibility of **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** and team; *Conceição da Silva Martins Rebouças; Rafaela Franco Moreira; Gabriela Quariguase Damasceno* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 02/15/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 02/2022 a 04/2023 Área: Departamento de Morfologia

Origem: Biotério Central da UFC

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 5 a 8 semanas

Quantidade: 40

Linhagem: Swiss

Peso: 20 a 25 g

Fortaleza, 19 de fevereiro de 2024

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal do Ceará

