



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL DE
S-NITROSOGLUTATIONA EM MATRIZ MUCOADERENTE MODULA
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM
RATOS

FORTALEZA

2014

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL DE
S-NITROSOGLUTATIONA EM MATRIZ MUCOADERENTE MODULA
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M341a

Martins, Conceição da Silva.

Aplicação tópica do gel de s-nitrosoglutationa em matriz mucoaderente modula marcadores inflamatórios na periodontite experimental em ratos / Conceição da Silva Martins. – 2014.

95 f. : il., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Clínica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Mestrado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Ciências da Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

1. S-nitrosoglutationa. 2. Doenças Periodontais. 3. Doadores de Óxido Nítrico. I. Título.

CDD 617.63

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL DE S-NITROSOGLUTATIONA EM
MATRIZ MUCOADERENTE DE HPMC NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Ciências Médicas da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção de Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner
Universidade Federal do Ceará (UFC) Sobral

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais José Martins e Dos Anjos,
pelo imenso amor, e apoio.

Ao meu esposo, Marlylton Rebouças
pelo incentivo, apoio e por tudo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e pela certeza de estar comigo em todos os momentos de minha existência.

À **Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito**, pela firme orientação neste trabalho de pesquisa e pela amizade, incentivo, paciência e atenção dedicada durante todo esse tempo.

À **Profa. Dra. Renata Leitão**, pela prestimosa atenção, pela amizade, incentivo e ajuda no projeto.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências médicas, da Universidade Federal do Ceará, **Profa. Dra. Flávia Almeida Santos**.

Ao Professor **Dr. Marcelo Oliveira Ganzarolli** da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela gentileza do fornecimento do medicamento usado neste trabalho.

À **Prof. Dra. Antôniella** pela ajuda nos procedimentos laboratoriais e pelo apoio durante nossa vida de pós-graduandos.

À **Profa. Dra. Helíada Chaves**, pela valiosa contribuição neste trabalho.

À amiga **Deisiane Viana**, pela indispensável colaboração no andamento dos experimentos e pela amizade dentro e fora da pós-graduação.

À **Dra. Deyse Wong** pela valiosa e fundamental ajuda neste trabalho.

À **Iracema**, pela ajuda, cuja participação foi decisiva.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, **Rita e Ivone** pela constante.

Aos bolsistas de iniciação científica, **Lauro, Gutierre e Glailton**, pelo apoio na realização dos experimentos.

À querida Família do Nempi, **Luana, Angélica Silva Santos, Danielle Foschetti, Maria Socorro França, Elilce Costa Frota e Michele**, pela amizade e companheirismo constantes, pela ajuda nos momentos difíceis e pela maravilhosa convivência e colaboração

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

“Somos o que fizemos dia após dia, de modo que a excelência não é um acto, senão um hábito”.

Aristóteles

RESUMO

As doenças periodontais possuem alta prevalência na população mundial e manifestam-se, principalmente, em duas entidades distintas, a saber: a gengivite induzida pela placa bacteriana e a periodontite. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma formulação contendo um doador de óxido nítrico, o S-nitrosoglutationa (GSNO), em matriz mucoaderente (HPMC) que permite a aplicação tópica e difusão lenta do GSNO na doença periodontal experimental (DPE). A DPE foi induzida por inserção de um fio de náilon 3.0 ao redor do segundo molar superior esquerdo, sendo utilizados os seguintes grupos experimentais: Grupo *naive*, Grupo tratado com HPMC e Grupos tratados com GSNO em diferentes concentrações (0,5, 2 ou 10 mM). Em seguida foram avaliados os seguintes parâmetros: análise do índice de perda óssea alveolar, dosagem de fosfatase alcalina óssea, análise histopatológica, dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β , IL-10, imunohistoquímica para iNOS, RANK, RANK-L, OPG e TRAP dosagem de nitrito e nitrato, determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e qPCR para TNF- α , RANK, RANK-L/OPG. O GSNO reduziu a perda óssea, aumentou a fosfatase alcalina óssea, reduziu o infiltrado inflamatório, a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , reduziu a expressão gênica de TNF- α , RANK e RANKL/OPG e a expressão proteica de iNOS, RANK e RANK-L, TRAP e aumentando a de OPG. Além disso, GSNO reduziu o estresse oxidativo, aumentando GSH e diminuindo MDA e NOx. Concluimos que o GSNO em gel com matriz mucoaderente é promissor para o tratamento da doença periodontal, porém estudos clínicos são necessários para avaliar seu efeito e sua toxicidade.

Palavras-chave: S-nitrosoglutationa. Doenças periodontais. Doadores de óxido nítrico.

ABSTRACT

Periodontal diseases, highly prevalent disease in worldwide population, manifest primarily in two distinct entities: plaque-induced gingivitis and periodontitis. In this study, we evaluated the effect of a formulation containing nitric oxide donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), in mucoaderente matrix (HPMC) in experimental periodontal disease (EPD). This mucoaderente formulation allows topical application and slow diffusion of GSNO. DPE was induced by insertion of a 3.0 nylon suture around the left upper second molar. Animals was divided in groups: naive, non-treated group, and groups treated with HPMC or GSNO (0.5, 2 and 10 mM). To evaluate the GSNO effects in DPE, we measured: the rate of alveolar bone loss, serum bone alkaline phosphatase, histopathology scores, cytokine assay, immunohistochemistry for iNOS, RANK, RANKL, OPG and TRAP, nitrite and nitrate levels, glutathione (GSH) levels and malondialdehyde (MDA) levels. Gene expression TNF- α , RANK, RANK-L and OPG was measured by qPCR. The GSNO reduced the bone loss, increased bone alkaline phosphatase, decreased the inflammatory cell infiltrate, decreased the release of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α and IL-10), diminish gene expression of TNF- α , RANK and RANL/OPG and the iNOS, RANK and RANK-L protein expression, increasing OPG protein expression. Moreover, GSNO reduced oxidative stress, increasing GSH and decreasing MDA and NOx levels. In conclusion, GSNO in mucoaderente formulation promise to improve periodontal disease treatment. However, clinical trials are required to evaluate effect and toxicity GSNO.

Keywords: S-nitrosoglutathione. Periodontal diseases. Nitric oxide donors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático do dente com seu periodonto	18
Figura 2	Esquema de relação entre o biofilme bacteriano e os sinais clínicos e patológicos da doença	21
Figura 3	Etapas da síntese de NO e L-citrulina	27
Figura 4	Estrutura química de S-nitrosuglutationa (GSNO).....	31
Figura 5	Metabolismo do S-nitrosuglutationa (GSNO).....	33
Figura 6	Estrutura química do HPMC.....	36
Figura 7	Efeito do GSNO sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) e em ratos wistar e submetidos à doença periodontal experimental e aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais e de animais submetidos doença periodontal experimental (DPE)	52
Figura 8	Fotomicrografias do periodonto de animais submetidos à doença periodontal (DPE) que receberam HPMC (veículo) ou GSNO e de animal normal sem DPE na coloração de Picrosírius	54
Figura 9	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratos Wistar submetidos a doença periodontal experimental	56
Figura 10	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de glutaciona reduzida (GSH) na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal (DPE)	57
Figura 11	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em gengivas de ratos	58
Figura 12	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)	59
Figura 13	Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) no periodonto de animais normais e de animais submetidos a DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10 mM.....	60
Figura 14	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de IL-1 β e TNF- α na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE).....	61

Figura 15	Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a concentração de IL-10 na gengiva de animais submetidos a doença experimental (DPE)	62
Figura 16	Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a expressão gênica de TNF- α , RANK, RANK-L/OPG na gengiva de ratos submetidos a doença periodontal experimental (DPE)	64
Figura 17	Imunohistoquímica para TRAP no periodonto de animais normais e de animais submetidos a DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10 mM.	66
Figura 18	Imunohistoquímica para RANK no periodonto de animais normais e de animais submetidos a DPE e que receberam HPM e GSNO 10Mm	68
Figura 19	Imunohistoquímica mostrando a marcação de RANK- L nos tecidos gengivais de ratos submetidos à DPE e tratados com GSNO	69
Figura 20	Imunohistoquímica para OPG no periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam HPMC e GSNO 10 mM	70
Figura 21	Modelo hipotético da redução da osteoclastogênese pelo GSNO na linhagem do osteoclasto na DPE.....	78

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Escores histopatológicos considerando o infiltrado celular inflamatório e a integridade do cimento e osso alveolar	43
Tabela 1	Sequência de oligonúcleotídeos de Primers usados no ensaio de qPCR.....	49
Tabela 2	Efeito do GSNO sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	3,3-diaminobenzidina-peróxido
DP	Doença periodontal
DPE	Doença periodontal experimental
EPM	Erro padrão da média
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FAT	Fosfatase alcalina total
g	Gramma
GCs	Gualinato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina-3,5-monofosfato cíclico
GSH	Glutathione
GSNO	S-nitrosoglutathione
GSPHx	Glutathione peroxidase
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenoico
HTAB	Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
mm ²	Milímetro quadrado
mmol l ⁻¹	Milimol por litro
mg	Miligramma
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina-dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NHA	N ^G -hidroxi-L-arginina

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Íon superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPG	Osteoprotegerina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada
pg	Picograma
PG	Prostagladina
PGE ₂	Prostagladina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PVA	Polivinil álcool
RANK	Receptor-ativador NF-κB
RANK L	RANK ligante
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio
r.p.m	Rotações por minutos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RSH	Intermediários reativos de nitrogênio
RSNO	S-nitrosotióis
SOD	Superóxido dismutase
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TIMP-	Inibidores teciduais das metaloproteinasas
TGF-β	Fator transformador de crescimento
TNF-α	Fator de necrose tumoral
°C	Graus Célsius

μl

Microlitro

μg

Micrograma

μm

Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Periodonto	17
1.2	Doença Periodontal	19
1.3	Óxido nítrico	26
1.4	Óxido nítrico e tecido ósseo	28
1.5	S-Nitrosotiol e S-Nitrosoglutationa	30
1.6	Hidroximetilcelulose (HPMC)	35
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Animais	39
4.2	Aparelhos, instrumentos laboratoriais, fármacos, anticorpos, soluções e corantes utilizados	39
4.3	Síntese de S-nitrosoglutationa (GSNO)	39
4.4	Indução da Doença Periodontal Experimental	40
4.5	Grupos Experimentais	41
4.6	Parâmetros Avaliados	41
4.6.1	<i>Análise do Índice de Perda Óssea Alveolar</i>	41
4.6.2	<i>Dosagem sérica da variação da fosfatase alcalina óssea</i>	42
4.6.3	<i>Análise histopatológica</i>	42
4.6.4	<i>Dosagem de citocinas</i>	43
4.6.5	<i>Imunohistoquímica para detecção da enzima oxido nítrico sintase induzida (NOSi), RANK, RANK L e TRAP</i>	44
4.6.6	<i>Dosagem de nitrito nitrato</i>	45
4.6.7	<i>Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	46
4.6.8	<i>Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na gengiva</i>	46
4.6.9	<i>Avaliação quantitativa da expressão gênica de TNF-α, RANK, RANK-L e OPG na gengiva</i>	47
4.6.9.1	<i>Preparação das amostras</i>	47
4.6.9.2	<i>Extração do RNA</i>	47

4.6.9.3	<i>Síntese do cDNA</i>	48
4.6.9.4	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	48
4.7	Análise Estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Efeito da administração tópica de S-nitrosoglutaciona (GSNO) na perda óssea alveolar e no aspecto macroscópico da hemiarcada superior esquerda de ratos na doença periodontal experimental (DPE)	51
5.2	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos	53
5.2.1	<i>Tabela dos escores histopatológicos</i>	53
5.3	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina óssea em ratos	55
5.4	Efeito da administração tópica de S- nitrosoglutaciona (GSNO) sobre os níveis de GSH na gengiva de ratos	56
5.5	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em gengivas de ratos	57
5.6	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)	58
5.7	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a imunomarcção de iNOS no periodonto de ratos submetidos á doença periodontal experimental(DPE)	59
5.8	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) em gengivas de ratos ..	61
5.9	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de citocina anti-inflamatória (IL-10) em gengivas de ratos	62
5.10	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a expressão gênica de TNF-α, RANK, RANK-L/OPG em gengivas de ratos	63
5.11	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a imunomarcção de TRAP no periodonto de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)	65
5.12	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a imunomarcção de	

	RANK no periodonto de ratos submetidos a doença periodontal experimental (DPE)	67
5.13	Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de RANK-L no periodonto de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)	69
5.14	Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de OPG no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE)	70
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE A – Aparelhos e Intrumentos Laboratóriais	93
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Periodonto

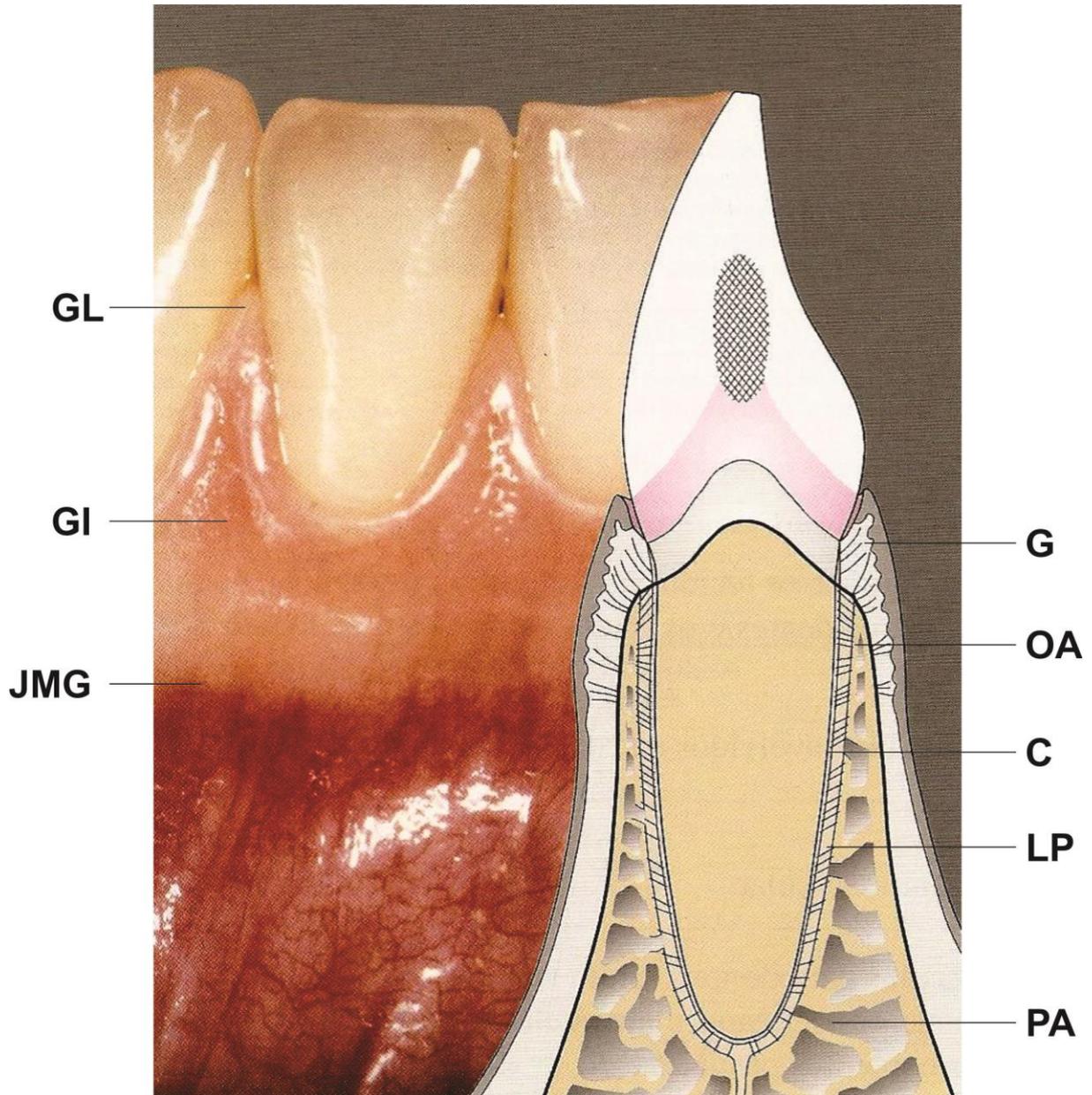
O periodonto é um complexo tecidual que liga o dente ao osso da maxila ou da mandíbula e forma unidade estrutural e funcional constituída pela: gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Figura 1). Estes três últimos componentes constituem o periodonto de inserção, enquanto a gengiva compõe o periodonto de proteção (PETERSEN; OGAWA, 2005).

A gengiva é o elemento do periodonto que se sobrepõe ao osso alveolar e envolve toda porção cervical do dente. Constitui o único dos tecidos periodontais que é diretamente visível sob a inspeção em condições normais (HOLMSTRUP, 2001). Pode ser dividida em gengiva inserida, que apresenta coloração rosada e consistência firme, e gengiva marginal livre, a qual é arredondada de modo a formar uma pequena invaginação ou sulco entre o tecido gengival e o dente (sulco gengival). De forma geral, a gengiva é formada por densas redes de fibras colágenas que promovem firmeza do tecido, inserção ao cemento e osso alveolar (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2010).

O ligamento periodontal é formado por tecido conjuntivo denso vascularizado com substância fundamental amorfa. As fibras colágenas do ligamento periodontal ligam o cemento radicular ao osso alveolar e situam-se no estreito espaço entre esses dois, promovendo a ancoragem do dente. O colágeno tipo I representa aproximadamente 80% do componente das fibras do ligamento periodontal, sendo o tipo III o segundo mais comum (CARRANZA; BERNARD, 2004). Além dessas, existem também algumas fibras elásticas, as quais estão incorporadas na parede dos vasos sanguíneos arteriais (HOLMSTRUP, 2001).

O cemento radicular consiste em um tecido calcificado especializado que recobre a superfície radicular dos dentes. Sua função é fixar as fibras do ligamento periodontal, bem como contribuir para o processo de reparo após danos à superfície radicular. O osso alveolar está continuamente sofrendo remodelação como resultado de sua adaptação (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2010; HOLMSTRUP, 2001).

Figura 1- Desenho esquemático do dente com seu periodonto, G: gengiva, C: cimento, LP: ligamento periodontal. OA: osso alveolar, PA: processo alveolar, GL: gengiva livre; GI: gengiva inserida; JMG: junção mucogengival. Adaptado de Carranza e Bernard (2004).



Fonte: Wolf et al, 2006.

1.2 Doença Periodontal

As doenças periodontais (DPs) possuem alta prevalência na população mundial e manifestam-se, principalmente, em duas entidades distintas, a saber: a gengivite induzida pela placa bacteriana e a periodontite. A gengivite é uma inflamação gengival sem perda de inserção, causada pelo biofilme bacteriano que se acumula na superfície dental adjacente à gengiva. É caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e pelo influxo de células (leucócitos polimorfonucleares e monócitos-macrófagos) do sangue periférico para o tecido conjuntivo periodontal (KINNEY; RAMSEIER; GIANNOBILE, 2007).

Por outro lado, a periodontite caracteriza-se por inflamação que se estende às estruturas periodontais mais profundas com perda de inserção, destruição de colágeno e reabsorção óssea (KINNEY; RAMSEIER; GIANNOBILE, 2007; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Se a doença não for tratada, a destruição óssea continua levando à mobilidade do dente com perda dentária subsequente (KINNEY; RAMSEIER; GIANNOBILE, 2007).

A periodontite, a qual é considerada uma importante causa de perda dentária em adultos, constitui um fator de risco significativo para as doenças diabetes tipo II, parto prematuro e doenças cardiovasculares (MATTHEWS *et al.*, 2006; PANJAMURTHY; MANOHARAN; RAMACHANDRAN, 2005; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças periodontais apresentaram alta incidência e prevalência na população brasileira, em que apenas 22% dos adultos e 8% dos idosos exibiram saúde periodontal (BRASIL, 2004).

Gaio *et al.* (2012) avaliaram o índice da doença periodontal no sul do Brasil e observaram uma incidência de 79% de idosos com doença periodontal. Com o aumento da expectativa de vida da população, espera-se um crescimento na prevalência e gravidade da doença, já que o número de pessoas que conservam seus dentes naturais também tem se tornado maior (GOLUB; RYAN; WILLIAMS, 1998).

A cavidade oral possui uma considerável microbiota vivendo em simbiose com o hospedeiro saudável. Estima-se que mais de 700 espécies bacterianas colonizam a cavidade oral, das quais 400 colonizam a área subgengival (LÓPEZ-PÍRIZ; AGUILAR; GIMÉNEZ, 2007). Esta microbiota é formada tanto por espécies aeróbicas como anaeróbicas. Esses microrganismos crescem na superfície do dente como um complexo biofilme com colônias interdependentes (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). A deficiência da

higiene oral leva a um aumento da quantidade de microrganismos no biofilme. Com isso, haverá mudanças nos fatores ecológicos locais, o que levará a alterações nos microrganismos e permitirá o aparecimento de novas espécies (RODRIGUES; NEWMAN, 2002). Assim, os microrganismos que eram principalmente gram-positivos facultativos e sacarolíticos são substituídos por uma microbiota bacteriana predominantemente gram-negativa, anaeróbica e proteolítica (LÓPEZ-PÍRIZ; AGUILAR; GIMÉNEZ, 2007). Além das bactérias, outros microrganismos podem compor o biofilme, tais como fungos, protozoários e vírus (RODRIGUES; NEWMAN, 2002).

De forma particular, espécies gram-negativas anaeróbicas estão aumentadas na placa subgingival como também na doença periodontal grave, mostrando que uma alteração neste microambiente contribui para a destruição tecidual. Números crescentes de várias espécies bacterianas, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e *Fusobacterium nucleatum*, estão elevados em pacientes com periodontite e a presença destes microrganismos está positivamente correlacionadas com o aumento da profundidade da bolsa periodontal e da perda progressiva do ligamento periodontal (SIQUEIRA JUNIOR; ROÇAS, 2013; KESAVALU *et al.*, 2007).

Dados semelhantes foram encontrados em nosso laboratório, onde mostramos que a microbiota bacteriana presente no tecido gengival de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE) era composta, principalmente, de *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram-negativos pigmentados, sendo diferentes da microbiota de ratos normais, isto é, sem DPE (MENEZES *et al.*, 2005).

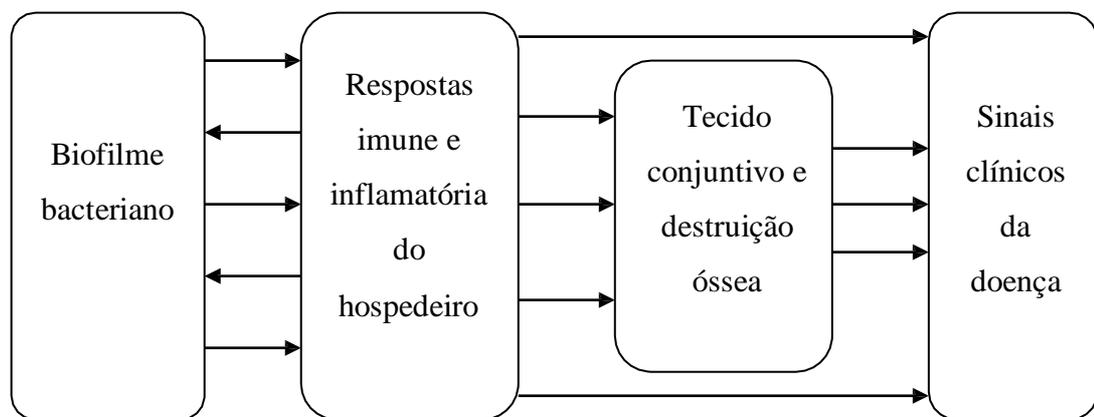
A maioria destes microrganismos pode causar destruição tecidual por meio de duas formas: diretamente, através da invasão do tecido pelos mesmos, os quais liberam substâncias nocivas que induzem morte celular e necrose tecidual; e, indiretamente, através da ativação de células inflamatórias que produzem e liberam mediadores com potentes atividades pro-inflamatória e catabólica (BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009).

Embora as bactérias sejam fatores etiológicos, a progressão e a gravidade da doença periodontal são determinadas pela resposta imune e inflamatória do hospedeiro (BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009; HONDA *et al.*, 2006; VAN DYKE; SERHAN, 2003). A resposta do hospedeiro diante dos microrganismos patogênicos envolve uma complexa organização entre os componentes celulares e humorais do sistema imune. A

evolução da gengivite para periodontite e o ritmo de progressão da periodontite não podem ser explicados somente pela presença da microbiota (BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009).

A resposta imunoinflamatória que ocorre nos tecidos periodontais devido à presença crônica do biofilme bacteriano resulta na destruição dos componentes estruturais do periodonto, levando aos sinais clínicos da doença periodontal (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais são definidos pela resposta do hospedeiro perante o biofilme bacteriano.



Fonte: Kornman (2001).

A primeira linha de defesa contra as bactérias patogênicas presentes no periodonto é formada pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN). Estes constituem 90% dos leucócitos existentes na cavidade oral, sendo os 10% restantes constituídos por células mononucleares. No sulco gengival, os PMNs tentam eliminar as bactérias através da fagocitose. Além disso, essas células liberam substâncias inflamatórias e antibacterianas capazes de eliminar os microrganismos, tais como lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, proteínas catiônicas, mieloperoxidase (MPO), bem como espécies reativas de oxigênio (BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2008; MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997; ÖVER *et al.*, 1993).

Contudo, algumas bactérias periodontopatogênicas escapam dos neutrófilos produzindo um fluxo constante desses fagócitos no sulco gengival, ocasionando a degranulação e o acúmulo contínuo destas células (BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009). Nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, há uma enzima denominada mieloperoxidase (MPO), a qual é considerada antibacteriana devido às espécies reativas geradas a partir do sistema MPO-H₂O₂-haletos. Contudo, em condições patológicas, a ativação persistente do

sistema MPO-H₂O₂ dos fagócitos ativados pode afetar adversamente os tecidos (MALLE *et al.*, 2007; YAMALIK *et al.*, 2000; ÖVER *et al.*, 1993; BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

A MPO pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido. Quando os tecidos periodontais encontram-se inflamados, ocorre um aumento no número de PMNs nestes tecidos e, conseqüentemente, há uma elevação na atividade da MPO (MARCACCINI *et al.*, 2010; BORGES JUNIOR *et al.*, 2007; ÖVER *et al.*, 1993). Em nosso laboratório, foi mostrado que a atividade de MPO encontra-se aumentada em gengiva de ratos submetidos à DPE na 6ª hora após a indução da doença (MENEZES *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a atividade da MPO apresenta-se significativamente menor após terapia periodontal ou em pacientes periodontalmente saudáveis (MARCACCINI *et al.*, 2010; BORGES JUNIOR *et al.*, 2007; ÖVER *et al.*, 1993).

A infiltração dos PMNs e sua ativação nos tecidos inflamados são mediadas por quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas, entre estas podemos citar interleucina-1 β (IL-1 β), IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF). Estas citocinas são consideradas pró-inflamatórias. Em contrapartida, os neutrófilos ativados podem produzir mais destes mediadores levando a uma auto-amplificação do recrutamento e da ativação dos PMNs, amplificando e perpetuando a resposta inflamatória e a destruição tecidual (VAN DYKE; SERHAN, 2003; LIU *et al.*, 2001).

As citocinas são proteínas solúveis, as quais transmitem informações de uma célula à outra através de mecanismos autócrinos ou parácrinos. Em geral, as citocinas atuam com a finalidade de eliminar microrganismos parasitas e reparar o dano tecidual. Contudo, as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , desencadeiam eventos de sinalização intracelular e comportamentos celulares catabólicos através de ligações específicas a seus receptores (OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002; KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

As citocinas desempenham importante papel na patogênese da doença periodontal. As principais citocinas envolvidas na periodontite são a IL-1 β e TNF- α , as quais estão em concentrações elevadas nesta patologia. Estas citocinas atuam direta e sinergicamente estimulando a degradação da matriz de tecido conjuntivo, recrutamento e/ou ativação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (LIU *et al.*, 2001; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000;

KJELDSEN *et al.*, 1995). Elas compartilham muitas propriedades biológicas em virtude de estimularem mensageiros intracelulares semelhantes, mesmo por diferentes mecanismos, ativando a mesma cascata de metabolismo intracelular (KOBAYASHI *et al.*, 1999).

Os níveis destas citocinas no sulco gengival relacionam-se diretamente à gravidade da doença periodontal (GORSKA *et al.*, 2003). Shaddox *et al.* (2011), mostraram em seu estudo que os mediadores inflamatórios TNF- α e INF γ , IL1 β , IL2, IL6, IL10, I12p40, fator estimulador de colônias granulócito- macrófago (GM-CSF) e MIP1- α se apresentam elevados na doença periodontal avançada quando comparado à gengiva saudável.

A IL-1 β é uma citocina multifuncional, que afeta muitos tipos celulares e possui potentes propriedades inflamatórias e estimulatórias. É sintetizada predominantemente pelos macrófagos/monócitos e linfócitos, contudo, pode ser produzida por outras células, tais como neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais. Essa citocina desempenha um importante papel na patogênese da doença periodontal destrutiva. Sua produção nos tecidos gengivais inflamados e no fluido crevicular dos pacientes com periodontite é elevada, mostrando-se diminuída após tratamento periodontal (LINS *et al.*, 2007; KELES *et al.*, 2005; BOCH; WARA-ASWAPATI; AURON, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 1999).

A IL-1 β estimula a produção de mediadores catabólicos do tecido conjuntivo e do osso, incluindo a própria IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandina E2 (PGE2) e metaloproteinases de matriz (MMP). Esses fatores contribuem para a perpetuação da degradação do tecido conjuntivo, bem como com o recrutamento e ativação dos osteoclastos (BOCH; WARA-ASWAPATI; AURON, 2001; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Ressalta-se que a atividade ósteo-reabsortiva da IL-1 β parece ser prostaglandina-dependente. Além da estimulação osteoclástica, esta citocina também exerce quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos (LINS *et al.*, 2007). Ademais, promove a ativação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e estimulação da produção de anticorpos, modulação da função da célula endotelial, o qual inclui a liberação de GM-CSF, prostaciclina (PGI2) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (PREISS; MEYLE, 1994).

O TNF- α é uma proteína trimérica, secretada por monócitos-macrófagos e desempenha um papel fundamental na doença periodontal como mediador da destruição tecidual (LINS *et al.*, 2007; SANDROS *et al.*, 2000; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; ROSSOMANDO; WHITE, 1993). Essa citocina exerce importante papel

na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. TNF- α estimula a produção local de prostaglandina, induz a secreção de MMP, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local. (LINS *et al.*, 2007; SANDROS *et al.*, 2000; ROSSOMANDO; WHITE, 1993). Além disso, o TNF- α também auxilia os leucócitos em sua capacidade de adesão às células endoteliais, aumentando sua capacidade de fagocitose e sua quimiotaxia (LINS *et al.*, 2007). Experimentos *in vitro* mostraram que essa citocina também é capaz de modular a função dos leucócitos polimorfonucleares (MEYLE, 1993).

Nosso grupo demonstrou a importância do TNF- α na doença periodontal experimental em ratos, através de estudos com inibidores da síntese de TNF - α (clorpromazina, pentoxifilina e talidomida), mostrando que estes reduziram de forma significativa o índice de perda óssea, as alterações histológicas e a leucocitose 11 dias após a indução da doença (LIMA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2000). Os metabólitos do ácido araquidônico também desempenham papel fundamental na doença periodontal. Eles são importantes mediadores catabólicos desta patologia, uma vez que são potentes estimuladores da reabsorção óssea, estão presentes nos tecidos gengivais e estão elevados em indivíduos com periodontite. Esses compostos são sintetizados a partir da metabolização do ácido araquidônico, através da ação da COX e lipoxigenase, e liberados em resposta à lesão tecidual local. Como exemplos destes metabólitos, podemos citar prostaglandinas, PGI₂, tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e outros ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE) (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

As prostaglandinas resultam da ação da COX sobre o ácido araquidônico. Atualmente, são conhecidas três isoformas de COX. A COX-1 é uma enzima constitutiva, encontrada em quase todas as células e possui funções fisiológicas, tais como citoproteção da mucosa gástrica. A COX-2 é expressa durante a reação inflamatória e promove a diferenciação celular, a mitogênese e a transdução de sinais. Elevados níveis de COX-2 são encontrados em várias doenças inflamatórias, entre as quais podemos citar artrite e periodontite (ZHANG *et al.*, 2003; VANE; BOTTING, 1998). Contudo, é importante ressaltar que a COX-2 também é fisiológica e está presente em diversos órgãos e tecidos normais, como cérebro, rins, ossos e endotélio vascular (GOLDEN; ABRAMSON, 1999). A terceira isoforma, a COX-3, é considerada uma variante de COX-1 e é encontrada principalmente no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

A prostaglandina E₂ (PGE₂) está envolvida na destruição tecidual que ocorre na periodontite. São encontrados elevados níveis de PGE₂ na gengiva e no fluido crevicular gengival de pacientes com esta patologia (AZOUBEL *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2003; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Ela promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, bem como a reabsorção óssea pelos osteoclastos (ZHANG *et al.*, 2003).

A eficácia dos antiinflamatórios não-esteoidais (AINEs) no tratamento da doença periodontal está associada à inibição dos metabólitos do ácido araquidônico (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Lohinai *et al.* (2010) mostraram um aumento significativo nos níveis de PGE₂ bem como na expressão da isoforma COX-2 durante a doença periodontal experimental em relação ao grupo sem a doença. Resultado semelhante foi encontrado por Zhang *et al.* (2003), que mostraram níveis aumentados de COX-2 no tecido gengival inflamado de pacientes com periodontite quando comparado com pacientes periodontalmente saudáveis.

Em nosso laboratório, Bezerra *et al.* (2000) observaram que a inibição da COX-2, promovida por AINEs, foi capaz de prevenir a perda óssea alveolar na doença periodontal experimental. Ainda em nosso laboratório, Azoubel *et al.* (2007) observaram que o uso do etoricoxib, um inibidor seletivo da COX-2, reduziu o infiltrado inflamatório, a destruição das fibras colágenas e a reabsorção do osso e do cimento na periodontite experimental. Em outro trabalho, Azoubel *et al.* (2008) mostraram que o uso do etoricoxib por pacientes com periodontite agressiva promoveu uma redução nos níveis de PGE₂ no fluido crevicular gengival em humanos, o que pode estar relacionada com a discreta melhora da condição óssea.

O óxido nítrico (NO) também aparece na cascata inflamatória que ocorre na doença periodontal. Nos tecidos periodontais, o NO faz parte dos mecanismos de defesa não-específicos da cavidade bucal contra bactérias patogênicas, com importantes funções fisiológicas em baixa concentração. Contudo, em resposta a um estímulo inflamatório, são sintetizadas altas concentrações de NO, as quais são citotóxicas para bactérias, fungos, protozoários e células tumorais. Essas altas concentrações fazem com que o NO produza efeitos prejudiciais ao próprio hospedeiro, contribuindo para a destruição tecidual na periodontite (BATISTA *et al.*, 2002; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Em nosso laboratório, foi demonstrada uma participação do NO nos eventos inflamatórios e na perda óssea da DPE em ratos, através de estudo com inibidores não-seletivos de NOS (L-NAME) e seletivos de NOS_i (aminoguanidina), os quais reduziram de

forma dose-dependente a perda óssea alveolar, bem como o influxo de células inflamatórias no local (LEITÃO *et al.*, 2005). Corroborando com dados da literatura que sugerem um efeito dual do NO, Leitão *et al.* (2004) também demonstraram que o doador de NO, isosorbida a 5%, reduziu a perda óssea alveolar e o infiltrado celular inflamatório, além de preservar o processo alveolar e o cemento. Esses estudos foram reforçados com um outro trabalho do grupo (MENEZES *et al.*, 2012) demonstrando que a aplicação intragengival do doador de óxido nítrico, s-nitroglutaciona (GSNO) apresentou efeito antiinflamatório e antioxidante em modelos de doença periodontal experimental, protegendo as estruturas do periodonto.

Na doença periodontal, também ocorre geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A destruição patológica relacionada às ROS está apoiada na presença de infiltração neutrofílica como evento principal na resposta do hospedeiro à invasão bacteriana. A presença do ânion superóxido nos tecidos periodontais resulta primeiramente da ativação de fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e está envolvido na reabsorção óssea. O radical hidroxil é capaz de iniciar uma clássica reação em cadeia conhecida como peroxidação lipídica, promovendo a vasodilatação e reabsorção óssea. Um exemplo do dano causado pelo peróxido de hidrogênio é a estimulação da fosforilação do complexo NF- κ B-I κ B, ativando NF- κ B, promovendo a produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-2, IL-6, IL-8 e TNF, bem como de NOSi, que são importantes para a patogênese da doença periodontal (BORGES JUNIOR *et al.*, 2007).

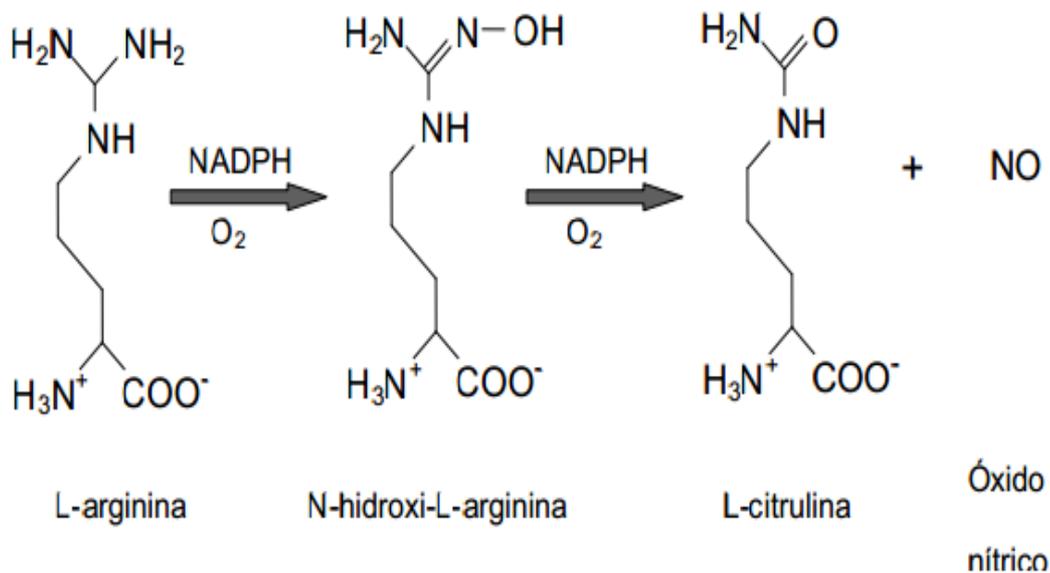
1.3 Óxido nítrico

Furchgott e Zawadzki (1980) observaram que o relaxamento vascular em resposta à ação da acetilcolina, necessitava de um endotélio intacto e que este efeito era mediado por um fator humoral lábil, que foi denominado Fator Relaxante Derivado de Endotélio (EDRF). Em 1987, foi proposto que este EDRF seria o óxido nítrico (MONCADA; HIGGS, 2006; MONCADA, 1991; IGNARRO *et al.*, 1987). O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, o qual possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado, podendo difundir-se livremente através das membranas (PANNU; SINGH, 2006).

O NO é sintetizado pela oxidação do nitrogênio guanidino-terminal do aminoácido L-arginina, formando L-citrulina como co-produto. Esta reação é catalisada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) (KOLIOS; VALATAS,

WARD, 2004; VAN'T HOF; RALSTON, 1997; IANARO, 1994; MARLETTA, 1993). Atualmente, foram identificadas três isoformas da enzima NOS. Duas destas isoformas apresentam-se constitutivamente no organismo, sendo denominadas NOS constitutiva (NOSc) e foram inicialmente descritas no tecido neuronal (NOSn) ou no endotélio vascular (NOSe). A terceira isoforma da NOS, identificada inicialmente em macrófagos, é expressa após estimulação por citocinas pro-inflamatórias, microrganismos ou produtos bacterianos, sendo denominada de óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (MONCADA; HIGGS, 2006; KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004; MONCADA, 1999).

Figura 3 - Etapas da síntese de NO e L-citrulina



Fonte: Dusse *et al.* (2003) e Marletta (1993).

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é o principal alvo bioquímico através do qual o NO realiza algumas de suas funções fisiológicas, promovendo o aumento do segundo mensageiro guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, GMPc (MONCADA; HIGGS, 2006; DIAS; SILVA; COLOMBARI, 2006).

O NO está presente em todos os vertebrados e desempenha importante papel em diversos processos biológicos, tais como a regulação do tônus vasomotor, inibição da agregação plaquetária e da proliferação celular do músculo liso vascular, resposta imune e neurotransmissão (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; SHISHIDO *et al.*, 2003; MONCADA, 1999). O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, possuindo ação antibactericida, antiparasitária e antiviral (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Contudo, o NO também pode ser um mediador pró-inflamatório, estando implicado na patologia de diversas doenças de origem inflamatória, além de outras condições patológicas, tais como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, inclusive as que envolvem reabsorção óssea, como artrite reumatóide e periodontite (LEITÃO *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2004; SHISHIDO *et al.*, 2003). Os efeitos biológicos do NO dependem de seu sítio de ação, de sua fonte de produção e de sua concentração (SHISHIDO *et al.*, 2003).

1.4 Óxido nítrico e tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por vários componentes, incluindo células específicas (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos), substâncias inorgânicas e colágeno, sendo o tipo I o de maior predominância (TAT *et al.*, 2009). Este tecido está continuamente sofrendo renovação e reparação, e a este processo denominamos de “remodelação óssea”. Neste, a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes, orquestrados pelas células do tecido ósseo. Os dois maiores tipos celulares responsáveis pela remodelação óssea são os osteoclastos e os osteoblastos (TAT *et al.*, 2009; SARAIVA; VANT HOF; RALSTON, 1997).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas formadas pela fusão dos precursores mononucleares, derivados de células progenitoras hematopoiéticas da linhagem dos monócitos/macrófagos, que chegam ao local da reabsorção via corrente sanguínea (LINS *et al.*, 2007; TAT *et al.*, 2009; VAN’T HOF; RALSTON, 1997). Os osteoclastos possuem morfologia e características próprias, como a formação de uma borda pregueada adjacente à matriz calcificada em reabsorção. Os osteoblastos entretanto são células de origem mesenquimal as quais se diferenciam a partir de células da medula óssea e são responsáveis pela síntese de nova matriz. Essas células são progressivamente transformadas em osteócitos quando envolvidas pela própria matriz secretada (TAT *et al.*, 2009).

Durante o ciclo de remodelação óssea, o osso maduro e danificado é reabsorvido pelos osteoclastos, através da secreção de ácidos e enzimas proteolíticas na superfície do osso. Subsequentemente, os osteoclastos migram para a área do osso onde está havendo reabsorção e sofrem apoptose. Eles são repostos pelos osteoblastos, os quais sintetizam nova matriz óssea (TAT *et al.*, 2009; VAN’T HOF; RALSTON, 1997). Em condições fisiológicas normais, a formação e a reabsorção óssea são fenômenos acoplados e dependentes. Este

equilíbrio promove homeostase óssea incluindo a manutenção da integridade estrutural e do metabolismo do cálcio (COCHRAN, 2008).

A tríade molecular composta por RANK (receptor-ativador NF- κ B)/RANKL (RANK ligante)/OPG (osteoprotegerina) é descrita como um sistema chave para o controle da diferenciação e da função dos osteoclastos. RANKL é produzido pelos osteoblastos, tanto na forma solúvel como na de membrana. Seu receptor RANK é expresso por células pré-osteoclásticas. A interação entre RANK-RANKL induz à diferenciação e à formação de osteoclastos maduros multinucleados (osteoclastogênese), estimulando, conseqüentemente, a perda óssea. OPG também é produzida pelos osteoblastos, atua como receptor solúvel para RANKL e exerce um efeito inibitório no processo de diferenciação dos pré-osteoclastos. Dessa forma, OPG através da ligação com RANKL, inibe a ligação RANK-RANKL, prevenindo a ativação de RANK e a osteoclastogênese, resultando na inibição da reabsorção óssea. Assim, RANKL pode ser descrito como sendo pro-reabsortivo e OPG como sendo um agente anti-reabsortivo (TAT *et al.*, 2009; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HAYNES, 2003)

Durante a resposta inflamatória, citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 e TNF- α , podem induzir a osteoclastogênese e perda óssea pelo aumento da expressão de RANKL. Adicionalmente, há uma diminuição da produção de OPG nos osteoblastos/estroma celular. Em contraste, mediadores antiinflamatórios, a saber IL-13 e interferon- γ (IFN- γ), podem diminuir a expressão de RANKL e/ou aumentar a expressão de OPG para inibir a osteoclastogênese (COCHRAN, 2008).

Osteoblastos e osteoclastos tanto produzem como respondem ao NO. O NO derivado dos osteoblastos podem atuar de forma autócrina ou parácrina, nos osteoclastos, durante a remodelação óssea (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001). Nesse processo, uma das formas de atuação do NO foi demonstrada por Fan *et al.* (2004) que mostraram que o NO diminuiu a expressão de RANKL em células do estroma da medula óssea *in vitro*, enquanto que aumentou a OPG, reduzindo, assim, o potencial osteoclastogênico.

O NO derivado da NOSe é importante para a função normal dos osteoblastos, como também para a resposta anabólica do osso ao estrógeno exógeno (AGUIRRE *et al.*, 2001; ARMOUR *et al.*, 2001). Riancho *et al.* (1995) mostraram que pequenas quantidades de NO, as quais são produzidas constitutivamente pelos osteoblastos, podem atuar como estimulador autócrino do crescimento do próprio osteoblasto. Estudos mostram que doadores

de NO estimulam o crescimento e a diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (MANCINI *et al.*, 2000; BUTTERY *et al.*, 1999).

Entretanto, altas concentrações de NO, tais como aquelas produzidas após estimulação de citocinas pró-inflamatórias, possuem potente efeito inibitório no crescimento e diferenciação dos osteoblastos (RALSTON *et al.*, 1994; DAMOULIS; HAUSCHKA, 1994), o qual deve ser, pelo menos parcialmente, em virtude do efeito pró-apoptótico do NO sobre os osteoblastos (DAMOULIS; HAUSCHKA., 1994).

De acordo com Van't Hof e Ralston (1997), altas concentrações de NO exógeno inibem a atividade e formação dos osteoclastos e este efeito é devido à apoptose dos progenitores dos osteoclastos. Contudo, Fukada *et al.* (2008) mostrou que o NO endógeno derivado da NOS α regula os efeitos das citocinas pró-inflamatórias no osso e é essencial para a progressão das lesões osteolíticas na periodontite apical experimental.

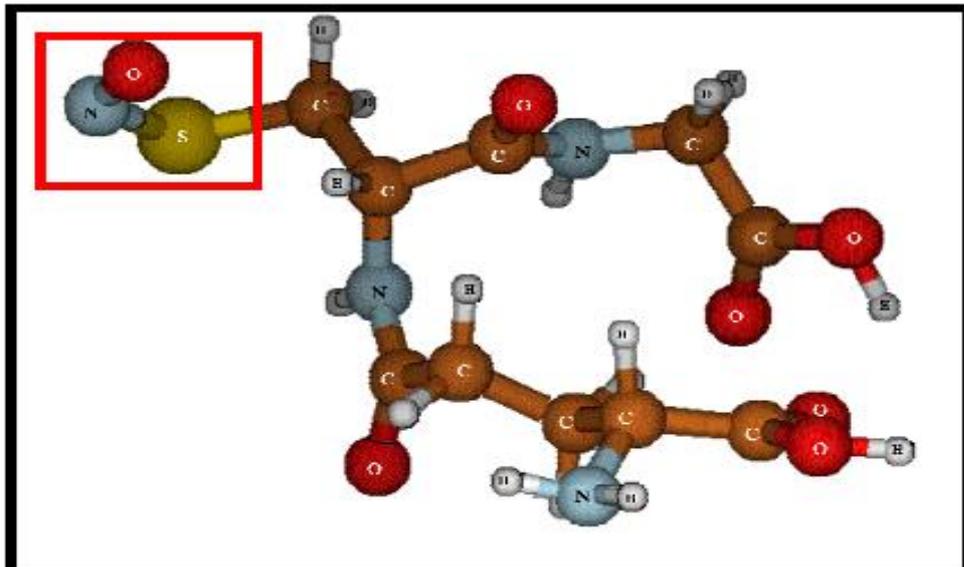
Um possível mecanismo para a inibição da atividade osteoclástica pelo NO é a modificação da catepsina K. A catepsina K é uma cisteína protease lisosomal, é altamente expressa nos osteoclastos e desempenha um papel fundamental no mecanismo de reabsorção óssea, em virtude de ser uma das poucas proteases capaz de degradar o colágeno, o qual representa 90% da proteína do osso. Tem sido mostrado que o NO bem como vários doadores de NO, podem inibir a atividade da catepsina K purificada (PERCIVAL *et al.*, 1999).

1.5 S-Nitrosotiol e S-Nitrosoglutathiona

Os S-nitrosotióis (RSNO) são compostos com estrutura genérica RSNO e foram sintetizados pela primeira vez em 1840 (HOGG, 2000). Eles emergiram como uma importante classe de drogas, que formam, a partir de sua degradação, NO e o dissulfito correspondente (NGUYEN *et al.*, 1992).

Os S-nitrosotióis (RSNO) contêm uma ligação química simples entre um grupo tiol (sulfidril) e a molécula de NO (SIMÕES, 2006; MILLER; MEGSON, 2007). Eles são doadores de NO e atuam também como reservatórios e transportadores de NO *in vivo*, devido a sua grande estabilidade em comparação ao NO livre (BUTLER; RHODES, 1997; AL-SA'DONI; FERRO, 2000; JOURD'HEUIL; JOURD'HEUIL; FEELISCH, 2003) Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química do S-nitrosoglutationa GSNO.



Fonte: Simões (2006).

Na figura o grupamento S-NO encontra-se destacado.

Muitas funções biológicas dos S-nitrosotióis foram descritas como sendo em virtude da: (1) liberação de NO; (2) transnitrosação; (3) S-tioação; e (4) ação direta. Isto ressalta o fato de que os S-nitrosotióis são mais do que simples doadores de NO. A transnitrosação pode ser definida como a transferência de um grupo nitroso funcional de um nitrosotiol a um tiol, o que ocorre devido ao ataque nucleofílico do ânion tiolato ao nitrogênio do S-nitrosotiol. Como produto da reação, haverá outro nitrosotiol e um tiol. Essa reação é reversível. A reação de S-tioação do RSNO envolve o ataque nucleofílico do enxofre do RSNO por um ânion tiolato, dando um dissulfito e ânion nitroxil como produtos (HOGG, 2000).

Os RSNOs também podem agir de forma direta. Os S-nitrosotióis são potentes agentes antiplaquetários e vasodilatadores. Essas funções são normalmente atribuídas à liberação de NO. Contudo, há evidências de que os RSNO podem exibir efeitos diretos sem a liberação de NO ou liberar NO localmente, sendo este funcionalmente diferente do NO endógeno. Em 1990, foi descrito que a capacidade de promover o relaxamento vascular desses compostos não está relacionada com a liberação espontânea de NO a partir do S-nitrosotiol (HOGG, 2000).

Mathews e Kerr (1993) encontraram resultados semelhantes em modelos de agregação plaquetária e relaxamento vascular, em que foram usados vários tipos de RSNOs.

Estes estudos enfatizam que a ação promovida pelo RSNO pode ocorrer devido seu efeito extracelular direto.

Os RSNOs possuem várias vantagens em relação a outros doadores de NO. Primeiramente, eles possuem seletividade tecidual. Por exemplo, o GSNO é seletivo para artérias em relação às veias, mostrando uma ação hemodinâmica diferente quando comparado aos nitratos orgânicos clássicos. Além disso, os RSNOs são potentes agentes antiplaquetários, inibindo a agregação em doses que não influenciam o tônus vascular. Outrossim, o S-nitrosotiol pode transferir NO^+ diretamente para a cadeia de outros tióis sem a liberação do NO livre (MILLER; MEGSON, 2007). Eles também contribuem para a transnitroação e formação sulfidril de proteínas enzimáticas, resultando no bloqueio reversível dos grupos tióis nas enzimas. A maioria das ações farmacológicas dos RSNO é uma consequência da nitroação das proteínas celulares (ACHUTH *et al.*, 2005).

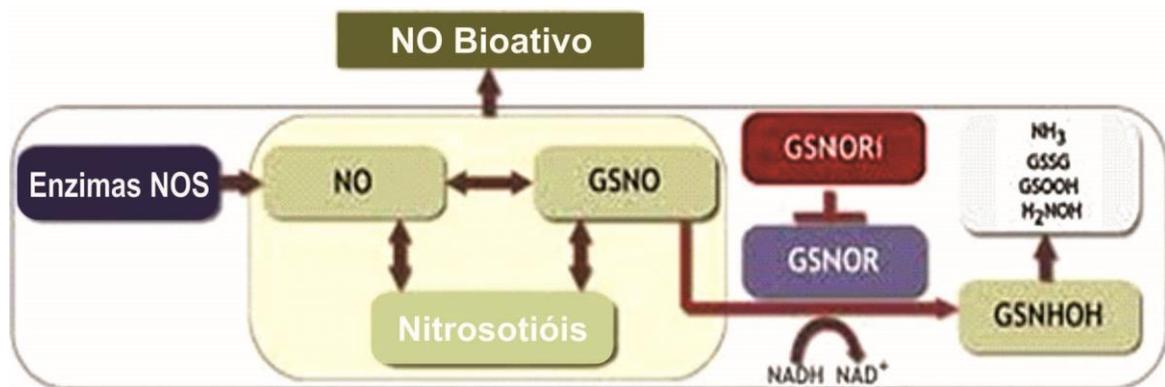
Os RSNOs também possuem efeito protetor contra a toxicidade celular associada com o estresse oxidativo. É geralmente aceito que o mecanismo pelo qual ocorre essa proteção é a liberação de NO seguida por uma reação de terminação radical-radical com a propagação do radical livre (HOGG, 2000).

Vários peptídeos e proteínas contendo a molécula sulfidril (SH) no resíduo de cisteína, como a glutatona (GSH) são encontrados endogenamente em tecidos e plasma de mamíferos. GSH, não-proteína tiol mais abundante *in vivo* (AL-SA'DONI; FERRO, 2000; HOGG, 2000), é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (FERREIRA; ABREU, 2007; VENKETARAMAN *et al.*, 2003). Ela está presente em várias células, onde desempenha importante função em reações enzimáticas e não-enzimáticas, protegendo o tecido contra o estresse oxidativo (KLOEK *et al.*, 2002; VENKETARAMAN *et al.*, 2003). Nas reações antioxidantes, GSH é convertida à sua forma oxidada, a glutatona dissulfito (GSSG), a qual torna a ser reduzida enzimaticamente em GSH a fim de manter o equilíbrio redox fisiológico. Em condições normais, 95-99% do total de GSH presente no corpo, está na forma reduzida (KLOEK *et al.*, 2002).

Além de ser antioxidante, a GSH desempenha função importante na manutenção da viabilidade celular, replicação do DNA, tiolação de proteínas, apoptose, regulação das funções das células imunes (VENKETARAMAN *et al.*, 2003), desintoxicação xenobiótica e transporte de aminoácidos (SINGH *et al.*, 1996b). A glutatona também funciona como molécula transportadora de NO, na forma de GSNO (VENKETARAMAN *et al.*, 2003).

GSNO é um dos mais importantes RSNOs encontrado *in vivo* (AMADEU *et al.*, 2007) e é formado pela reação da GSH com NO/O₂ (FERREIRA *et al.*, 2007). Contudo, de acordo com Singh *et al.* (1996), a reação direta da glutathiona com o NO não gera GSNO, mas forma dissulfeto glutathiona e o ânion nitroxil (NO⁻). O GSNO somente é formado se ocorrer a oxidação do NO através da reação com o oxigênio para formar NO₂ e N₂O₃. (Figura 5).

Figura 5 - Metabolismo do S-nitrosoglutationa (GSNO).



Fonte: Miranda (2012).

S-nitrosoglutationa é um metabólito fisiológico da glutathiona (GSH) e do NO e está envolvido em várias atividades farmacológicas e de sinalização. É várias vezes mais potente que a GSH contra o estresse oxidativo. Diferente de outros doadores de NO, o GSNO é um composto estável, não se decompõe espontaneamente e requer agentes ou enzimas adicionais para seu metabolismo, incluindo a GSNO redutase e o sistema tioredoxina (KHAN *et al.*, 2005; MIRANDA, 2012).

O GSNO é considerado um doador endógeno de NO e atua produzindo efeitos biológicos semelhantes ao NO, protegendo, também, contra o estresse oxidativo no endotélio, no miocárdio e no tecido cerebral (PANNU; SINGH, 2006).

Em modelo de acidente vascular cerebral (AVC) experimental, o tratamento com GSNO aumentou o fluxo sanguíneo cerebral, bem como reduziu a morte celular por apoptose através da inibição da caspase-3. A caspase-3 permanece inativada em sua forma nitrosilada. A via apoptótica induzida por Fas ativa a desnitrosilação da caspase-3, levando à sua ativação. O GSNO promove a nitrosilação da caspase-3 e, conseqüentemente, a inativação desta enzima (KHAN *et al.*, 2005).

Além disso, o GSNO inibe a inflamação tecidual através da S-nitrosilação de NF- κ B, resultando na supressão de NF- κ B. Com isso, há inibição da produção de citocinas pró-

inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β e diminuição de moléculas de adesão celular endoteliais, as quais promovem infiltração leucocitária (KHAN *et al.*, 2005; PANNU; SINGH, 2006; SAVIDGE *et al.*, 2007). O GSNO também reduz a expressão de NOSi, confirmando, mais uma vez, seu efeito antiinflamatório (KHAN *et al.*, 2005).

O GSNO é capaz de inibir a agregação plaquetária durante a angioplastia coronária e promove efeitos benéficos na injúria isquêmica/reperfusão, na pré-eclampsia e no tratamento do infarto agudo do miocárdio e da angina instável (LANGFORD *et al.*, 1994). Radomski *et al.* (1992) também mostraram o efeito inibidor do GSNO na adesão plaquetária ao colágeno fibrilar e às células endoteliais humanas.

Em estudos recentes, demonstraram-se que aplicações tópicas de GSNO foram capazes de melhorar a cicatrização cutânea em ratos, através da estimulação da contração da ferida e da reepitelização e também pela aceleração da fase inflamatória da cicatrização. O GSNO melhorou a maturação das fibras colágenas e a organização tecidual, bem como diminuiu a quantidade de células inflamatórias no tecido de granulação (GEORGII *et al.*, 2011; AMADEU *et al.*, 2007). Achuth *et al.* (2005) demonstraram que o GSNO administrado intraperitonealmente intensificou a deposição de colágeno em lesões, contudo não interferiu na atividade das MMP. Amadeu *et al.* (2007) mostraram que o GSNO foi capaz de aumentar a quantidade de mastócitos sem alterar sua função durante a cicatrização. Skeff *et al.* (2014) evidenciaram que o GSNO na mucosite oral induzida por 5-FU, foi capaz de reduzir a morte celular associada a esse quimioterápico, assim como reduziu o nível de bactéria periodontopatogênicas e contribuiu na aceleração da reepitelização.

O GSNO também é um broncodilatador endógeno com vários efeitos pulmonares benéficos. Ele promove relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas e aumento da ventilação-perfusão, melhora da motilidade ciliar e aumento da hidratação das vias aéreas. Níveis desta molécula estão diminuídos em pacientes asmáticos e fibrose cística, sendo proposto como agente terapêutico nestas patologias (ZAMAN *et al.*, 2006).

O GSNO é capaz de inibir a reabsorção óssea *in vivo*, através da inibição da atividade de catepsina K *in vitro*, bem como a maturação autocatalítica da enzima (PERCIVAL *et al.*, 1999). Vários trabalhos mostram que o GSNO possui efeito antimicrobiano (ZAMAN *et al.*, 2006; VENKETARAMA *et al.*, 2005; JOHN *et al.*, 2001).

De acordo com John *et al.* (2001), o oxigênio molecular é de fundamental importância para GSNO e nitrito eliminarem as bactérias. Isso ocorre porque nitrito e GSNO originam NO, o qual pode reagir com o ânion superóxido produzido pelas bactérias durante o

metabolismo aeróbico, formando peroxinitrito (OONO^-). O GSNO é um intermediário importante no metabolismo do NO e medeia muitas das vias de sinalização do NO através da modificação pós-translacional de proteínas, via reação de transnitrosação. Trata-se de uma reação reversível, na qual ocorre a transferência de NO, na forma de ion nitrosônio (NO^+), do nitrosotiol para um resíduo de cisteína de outro tiol, seja proteico ou de baixo peso molecular.

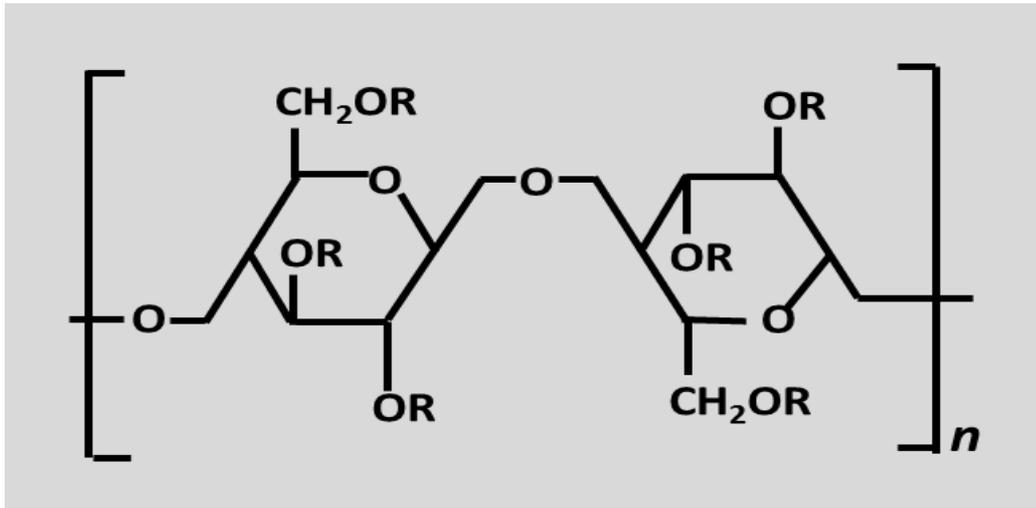
1.6 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

Nos últimos anos, há um crescente interesse em relação ao desenvolvimento de novos biomateriais que possam liberar o NO de forma controlada nos tecidos alvos onde esta molécula poderia ter efeito terapêutico. A incorporação de doadores de NO em matrizes poliméricas não-tóxicas permite o uso de materiais sólidos ou géis para aplicação tópica transdérmica ou implantação subcutânea (SEABRA *et al.*, 2005; SHISHIDO *et al.*, 2003), ou dentro da bolsa gengival em humanos.

Muitos sistemas de liberação de drogas baseiam-se nos chamados polímeros mucoadesivos, cujo objetivo é a adesão ao tecido subjacente (El-LEITHY *et al.*, 2010). Macromoléculas, como os poliacrilatos, os derivados da celulose e as quitosanas são exemplos de polímeros que vêm sendo usados como importantes excipientes nas formulações atuais (El-LEITHY *et al.*, 2010; VALENTA, 2005).

Atualmente, um dos derivados de celulose mais utilizado na preparação de matriz hidrófilas é hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), também denominada "hipromelose" ou metil-hidroxipropilmetilcelulose (FELLER; WILT, 1990). O HPMC é um éter de celulose onde parte dos hidrogênios e dos grupos hidroxilas da celulose foram substituídos por grupos alquil a fim de modificar as características da celulose nativa (PEKEL *et al.*, 2004). (Figura 6). Assim, HPMC tem sido usado como matriz para liberação controlada de fármacos em virtude de sua capacidade de formar gel em meio aquoso, por não ser tóxico e pela capacidade de acomodar elevadas quantidades de fármacos (VUEBA *et al.*, 2004; BAUMGARTNER *et al.*, 2000).

Figura 6 - Estrutura química do HPMC



Fonte: Vueba *et al.* (2004).

As matrizes que apresentam HPMC na sua composição, como agente modelador, permite utilização de fármacos insolúveis e solúveis tanto em concentração elevadas quanto baixas (KEARY, 2001). Adicionalmente o HPMC apresenta importante intumescimento que permite a rápida formação de uma camada solidificada que controla a liberação dos fármacos (LIN *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

A periodontite é considerada uma importante causa de perda dentária em adultos e constitui um fator de risco significativo para diversas doenças como: diabetes tipo II, parto prematuro e doenças cardiovasculares (PIHLSTROM *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2006). Os resultados de nosso grupo de pesquisa acerca da fisiopatologia da periodontite nos instigou a buscar opções terapêuticas para tratar essa enfermidade.

Pressupondo-se a participação do óxido nítrico no surgimento e evolução dessa doença, assim como a busca por meios preventivos e de tratamento. Buscou-se avaliar, em modelo de doença periodontal experimental, a aplicação tópica de uma formulação contendo um doador de óxido nítrico, o S-nitrosoglutationa (GSNO), em matriz mucoaderete (HPMC). Essa matriz permite a difusão lenta do GSNO, o que consiste no diferencial deste trabalho em relação aos anteriores de nosso grupo com doadores de NO.

Este projeto poderá contribuir substancialmente com a área de saúde bucal, com a geração de conhecimento científico de qualidade em um tema de relevância para Saúde Pública. As propriedades da GSNO, alternativa terapêutica alvo desta dissertação, combinadas à sua miscibilidade em veículos farmacêuticos não tóxicos, como HPMC, faz da formulação HPMC/GSNO, uma alternativa promissora para investigar o efeito da aplicação tópica de GSNO na doença periodontal experimental como realizado neste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação tópica de uma formulação contendo um doador de óxido nítrico, o S-nitrosoglutationa (GSNO), em matriz mucoaderente (HPMC) que permite a difusão lenta do GSNO na doença periodontal experimental (DPE) em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, o presente trabalho se propõe:

- Avaliar o efeito da aplicação local de GSNO em relação à perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal experimental;
- Avaliar o efeito da aplicação local de GSNO sobre a inflamação que ocorre na doença periodontal experimental através da análise de diversos parâmetros inflamatórios;
- Avaliar o efeito da aplicação local de GSNO sobre o estresse oxidativo na doença periodontal experimental;
- Avaliar o efeito do GSNO na expressão gênica e proteica de mediadores inflamatórios (TNF- α) e fatores associados ao metabolismo ósseo (RANK, RANK-L/OPG) na doença periodontal experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) através do protocolo nº 10/2013.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais por gaiola, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ num ciclo de 12h luz/12h escuro.

4.2 Aparelhos, instrumentos laboratoriais, fármacos, anticorpos, soluções e corantes utilizados

Durante o curso dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos, instrumentos, anticorpos, assim como fármacos soluções e corantes. Dentre os quais foram apresentados no apêndice dessa dissertação (Apêndice 1).

4.3 Síntese de S-nitrosoglutationa (GSNO)

A GSNO é sintetizada a partir da reação equimolar de glutatona (GSH) com nitrito de sódio (NaNO_2) em solução ácida de acordo com procedimentos já descritos anteriormente (DE SOUZA *et al.*, 2006). A glutatona foi dissolvida em solução de ácido clorídrico e o nitrito de sódio foi adicionado à solução, que permanecerá em repouso por 40 min, ao abrigo da luz e em banho de gelo. A GSNO foi precipitada com acetona, filtrada e liofilizada ao abrigo da luz. A GSNO sólida foi estocada a -20°C , ao abrigo da luz. O rendimento da reação foi medido espectrofotometricamente com base nas bandas de absorção

do grupo S-NO no UV (336 nm). A GSNO utilizada neste estudo foi gentilmente cedido pelo professor Marcelo Ganzarolli de Oliveira do Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Foi utilizada uma solução HPMC como veículo que permite a liberação lenta do GSNO nos modelos estudados foram realizadas dissoluções prévias de GSNO e HPMC separadamente em solução salina 0,9%, a fim de realizar, em seguida, a mistura das soluções supracitadas. As soluções HPMC/GSNO foram preparadas através da mistura de 0,5 mL da solução de GSNO nas concentrações 2,95; 11,8 e 59 mM em uma solução de HPMC obtida a partir de 2 g do pó do polímero com 2 mL de solução salina (10% w/w), resultando nas soluções HPMC/GSNO contendo GSNO nas concentrações 0,5, 2 e 10 mmol L⁻¹ com concentração final de HPMC a 8% w/w. A solução de HPMC a 8% w/w sem GSNO foi usada como controle.

4.4 Indução da Doença Periodontal Experimental

Os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/Kg) + xilazina (5mg/kg), ambas da Virbac, por via intraperitoneal (i.p). A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de sutura de náilon (3.0) (Plast Suture) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, uma guia nos espaços interproximais mesial e distal do dente supracitado foi utilizado, a fim de facilitar a colocação do fio. Este foi adaptado de modo que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular da cavidade oral do animal. Após 11 dias, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical.

O dia escolhido para o sacrifício foi o 11º dia de experimento, o qual foi baseado em estudos prévios de nosso grupo, que constatarem destruição total do processo alveolar e destruição importante do cimento (MENEZES *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2000).

4.5 Grupos Experimentais

Grupo *naive*

Esses animais não foram submetidos a nenhum estímulo ou procedimento inflamatório, nem a administração de nenhuma solução, a fim de verificar a existência de alguma alteração nos parâmetros analisados entre os grupos.

Grupo tratado com HPMC

Esses animais nos quais foi induzida a DPE, receberam apenas gel de HPMC na gengiva do segundo molar superior esquerdo duas vezes por dia (12 em 12 horas) após a cirurgia até o 11° dia.

Grupos tratados com GSNO

Esses grupos foram constituídos por animais que receberam administração de gel contendo GSNO nas concentrações de 0,5, 2 ou 10 mM. Aproximadamente 25µl de gel foi aplicado com o auxílio de microbrush na gengiva correspondente ao segundo molar superior esquerdo diariamente (a cada 12 horas) após a indução da DPE, sendo os animais sacrificados no 11° dia de experimento.

4.6 Parâmetros Avaliados

4.6.1 Análise do Índice de Perda Óssea Alveolar

Os animais foram sacrificados no 11° dia após o procedimento cirúrgico e suas maxilas foram removidas e fixadas no formol a 10%, durante 24 horas. Após esse período, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas (direita e esquerda), dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de distinguir o tecido ósseo dos dentes, os quais se coram com menos intensidade. As hemiarcadas foram montadas em cera utilidade e fotografadas. As imagens digitais obtidas foram submetidas à análise pelo software ImageJ. O software calcula a área correspondente aos dentes e à perda óssea alveolar das hemiarcadas com DPE, da qual será subtraída a área correspondente aos dentes na hemiarcada contralateral, para

obtenção da área real da perda óssea alveolar de cada rato. Essa área foi calculada inicialmente em pixels, que foi posteriormente convertidos em mm^2 . Essa conversão é possível devido ao uso de um padrão de milímetros fixado ao lado das maxilas.

4.6.2 Dosagem sérica da variação da fosfatase alcalina óssea

A dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade osteoblástica. Para avaliação deste parâmetro, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de ratos anestesiadas antes da indução da DPE e no 11º dia (dia do sacrifício). Após a coleta, o sangue foi centrifugado (1800 xg por 10 min) e o sobrenadante armazenado a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ até a análise bioquímica. Parte das amostras foi utilizada para a dosagem de Fosfatase Alcalina Total (FAT) dos animais, utilizando-se “Kit” específico, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®).

Posteriormente, uma amostra do material foi aquecida para obtenção da atividade da fosfatase alcalina óssea (FAO). O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100 μL da amostra foram incubadas em banho-maria a $56\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975).

4.6.3 Análise histopatológica

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Decorridos 11 dias após o procedimento cirúrgico (colocação do fio de náilon), os animais foram sacrificados e suas hemiarcadas, removidas. Estas foram fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a descalcificação com EDTA a 10% por aproximadamente 45 dias, para a desmineralização. A seguir, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 μm em micrótomo apropriado e as lâminas

obtidas foram coradas pelos métodos de Picrosírius Red. Este método fornece melhor visualização microscópica das fibras colágenas presentes no ligamento periodontal.

Para a análise microscópica da hemiarçada com a coloração Picrosírius Red e determinação do escore histopatológico, foi considerada a região entre os 1° e 2° molares, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cemento. Tais achados foram classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA, citados no quadro a seguir:

Quadro 1- Escores histopatológicos considerando o infiltrado celular inflamatório e a integridade do cemento e osso alveolar.

Escore 0:	Ausência ou somente discreta infiltração celular (infiltração de células inflamatórias esparsas e restrita à região da margem gengival); Processo alveolar e cemento preservados.
Escore 1:	Infiltrado celular moderado (infiltração celular inflamatória sobre toda a gengiva); Pequena reabsorção do processo alveolar; Cemento preservado.
Escore 2:	Infiltrado celular acentuado (infiltração celular inflamatória na gengiva e no ligamento periodontal); Degradação acentuada do processo alveolar; Destruição parcial do cemento.
Escore 3:	Infiltrado inflamatório acentuado; Completa reabsorção do processo alveolar; Destruição severa do cemento.

Fonte: Leitão *et al.* (2005).

4.6.4 Dosagem de citocinas

No 11° dia, os animais foram sacrificados e suas gengivas, após serem removidas, foram congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão PBS. A detecção das citocinas IL-1 β e TNF- α e IL-10 foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Brevemente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18 horas a 4°C com 100 μ L por poço

de anticorpo de captura para IL-1 e TNF- α . Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μ L por poço BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100 μ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 e TNF- α . Após o período de incubação à 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μ L de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems Catalog – DY999) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H₂SO₄), e a absorbância medida à 450nm. Expressou-se os resultados obtidos em pg/mL.

4.6.5 Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), RANK, RANK L, OPG e TRAP

A imunohistoquímica para NOSi, RANK, RANK-L, OPG e TRAP, foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 11º dia, os animais foram sacrificados e suas maxilas removidas, fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a tratamento com EDTA 10% para a desmineralização. A seguir, as hemiarçadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em banho maria, por 20 minutos para a recuperação antigênica a 65 °C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos) em seguida foi realizado o bloqueio de proteína com soro bovino (BSA) 1 % por 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NOSi diluído 1:100, com anticorpo policlonal primário de cabra para RANK diluído em

1:200 ou com anticorpo policlonal primário de cabra para RANK-L diluído em 1:200 ou anticorpo policlonal de cabra para TRAP diluído 1:100 ou anticorpo policlonal de cabra para OPG diluído 1:100 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho e anti-IgG cabra, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

4.6.6 Dosagem de nitrito/nitrato

No 11º dia, os animais foram sacrificados e suas gengivas, após serem removidas foram congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. A dosagem de nitrito/nitrato foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) na gengiva através da concentração total nas amostras, determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN et al., 2000). Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em 100 μL de uma solução gelada de cloreto de potássio (KCL) a 1,15% (homogenato a 10%). O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. O nível total de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ foi determinado como NO_3^- das amostras (0,04 mL) convertido em NO_2^- pela incubação em uma solução de 0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada “overnight”. Foram utilizadas placas de 96 poços, adicionando 80 μL da amostra experimental em cada poço, em duplicata. Uma série de diluições da curva-padrão de referência de NO_2^- (640 μM , 320 μM , 160 μM , 80 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM e 0,625 μM) foram preparadas. A seguir, foram adicionados 80 μL da solução de Griess (2% de sufamilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão e expressos em Nox (μM).

4.6.7 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona (GSH) é considerada um antioxidante fisiológico (KLOEK *et al.*, 2002; VENKETARAMAN *et al.*, 2003). Para a determinação de GSH foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay, 1968. Aproximadamente 30 mg da gengiva da região de molares superiores do lado esquerdo foram homogeneizados em 300 µL de EDTA 0,02 M gelado. A uma alíquota de 400 µL do homogenato foi adicionado 320 µL de água destilada, mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%, seguido de agitação e filtração. Foram retirados 200 µL do filtrado e adicionados 400 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 10 µL de DTNB. A absorbância foi determinada dentro de 5 min a 412 nm. A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH/mg de tecido.

4.6.8 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na gengiva

A concentração de malondialdeído nos tecidos é utilizada como indicador da peroxidação lipídica (ANTUNES, 2008). Os níveis de malondialdeído na gengiva foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da gengiva com aproximadamente 30 mg da região de molares superiores do lado esquerdo foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para preparar 10% de homogenato. Meio mililitro (0,5ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml, 3ml de H₃PO₄ (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%) foram acrescentados. Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um vortexador, centrifugados a 1200 *xg* por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de gengiva.

4.6.9 Avaliação quantitativa da expressão gênica de TNF- α , RANK, RANK-L e OPG na gengiva.

4.6.9.1 Preparação das amostras

Retirou-se a gengiva dos animais do grupo Naive, HPMC (grupo com DPE tratado com o veículo) e GSNO na concentração de 10 mM. O tecido gengival foi colocado em microtubo com 1 ml de trizol. Em seguida os tecidos foram macerados e armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

4.6.9.2 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (BioRad, Califórnia, USA). Brevemente, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio nas amostras maceradas, em seguida foram vertidas por 15 segundos. Logo depois, as amostras foram centrifugadas em 12.000xg por 15 minutos em 4°C. Após esse processo, em cada microtubo foi observado três fases: uma superior, fase aquosa incolor (RNA), uma fase intermediária branca (proteínas e DNA) e uma inferior, fase orgânica de coloração avermelhada (DNA e proteínas). Após a centrifugação, a fase aquosa incolor foi transferida para um microtubo. Em seguida, foi pipetado 700 μ l das amostras e inseridas em uma coluna de ligação ao RNA, sendo, logo em seguida centrifugada: 60 segundos em 12.000xg. Na etapa seguinte, adicionou-se 700 μ l de solução de lavagem de estringência (SLE) à coluna de ligação ao RNA e foi realizada nova centrifugação utilizando as mesmas condições realizadas na etapa anterior. Para remover possíveis fragmentos de DNA, foi adicionado 80 μ l de DNase I em cada coluna, onde foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Após este período, adicionou-se 700 μ l de SLE nas colunas, sendo as amostras homogeneizadas pipetando para cima e para baixo e centrifugadas: 2 min, 12.000xg para remover os resíduos de SLE. Por fim, o RNA da coluna de ligação foi transferido para um microtubo, acrescentando 40 μ l de solução de diluição no centro da membrana na parte inferior da coluna, onde foram incubadas por 1 min e centrifugadas por 2 min em 12.000xg para a remoção do RNA total.

Após a extração do RNA de cada amostra, realizou-se sua quantificação, com 1 μ l de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em ng/ μ l foi realizada a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280 fornecido pelo programa relacionado ao aparelho.

A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra para realização da próxima etapa, a saber: síntese do cDNA. Após a quantificação, os RNAs extraídos foram armazenados no freezer a -80°.

4.6.9.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Califórnia, USA). O volume final de cada amostra foi de 20 µl: 4 µL era do reagente 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e primers aleatórios); 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1ng RNA, onde o volume utilizado em µL, foi dependente da concentração inicial extraída; água livre de RNase para completar 20 µL. O protocolo da reação foi 25° C por 5 min., 42° C por 30 min., 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR.

4.6.9.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A transcrição dos genes de TNF- α , RANK, RANK-L e OPG foi avaliada utilizando o iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). O gene de referência utilizado foi o Gapdh. Todos os primers utilizados e as condições da qPCR estão na Tabela 2. Cada reação foi constituída por 10 µL iQ Supermix (BioRad) (tampão padrão para a amplificação com os seguintes reagentes: DNA-polimerase, dNTPs, e tampão de solução salina em concentrações ótimas para PCR em tempo real), 2 µL de cada primer senso e anti-senso (0,2 µM) e 1 µL de cDNA das amostras e água livre de nuclease para um volume final de 20 µL.

Os valores de “Threshold cycle” (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes testados foram exportados para o Microsoft Office Excel 2007, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, na qual $\Delta\Delta CT = (Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene de referência do grupo tratado}) / (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência do controle})$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os valores de RNAm obtidos de RANK-L e OPG foram expressos por meio de uma razão entre RANK-L/OPG.

Tabela 1- Sequência de oligonucleotídeos dos Primers usados no ensaio de qPCR

Processo relacionado	Gene	Sequência de primer (5'-3')	Produto (bp)	NCB I	qPCR		
Inflamatório	TNF- α	S- GACCCTCACACTCAGATCATCT TCT A- TGCTACGACGTGGGCTACG	64	NM- 0126 75			
		S- AGGGAAAACGCTGACAGCTAA A- CCAACACAATGGTCCCCTGA			96	NM_ 0012 7123 5	
		S- GCCAACCGAGACTACGGCAA A- GAACATGAAGCGGGAGGCG					141
		S- CCTAGAGAGAAATGTCGTAG GATT A- CATTCCACACTGGAAACCTG A			145	NM_ 01287 0	
S- TGATTCTACCCACGGAAGTT A- TGATGGGTTTCCCATTGATG A	68	NM_ 0170 08					
Referência			GAPDH				

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (S: senso; A: antisenso; bp: pares de base).

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Para comparação entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA), one way, com correção de Bonferroni. Estes testes foram realizados por meio do programa GraphPad Prism 5.0. O intervalo de confiança utilizado nesse estudo foi de 95%.

Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como mediana e o teste estatístico aplicado foi do Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns para dados não-paramétricos. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

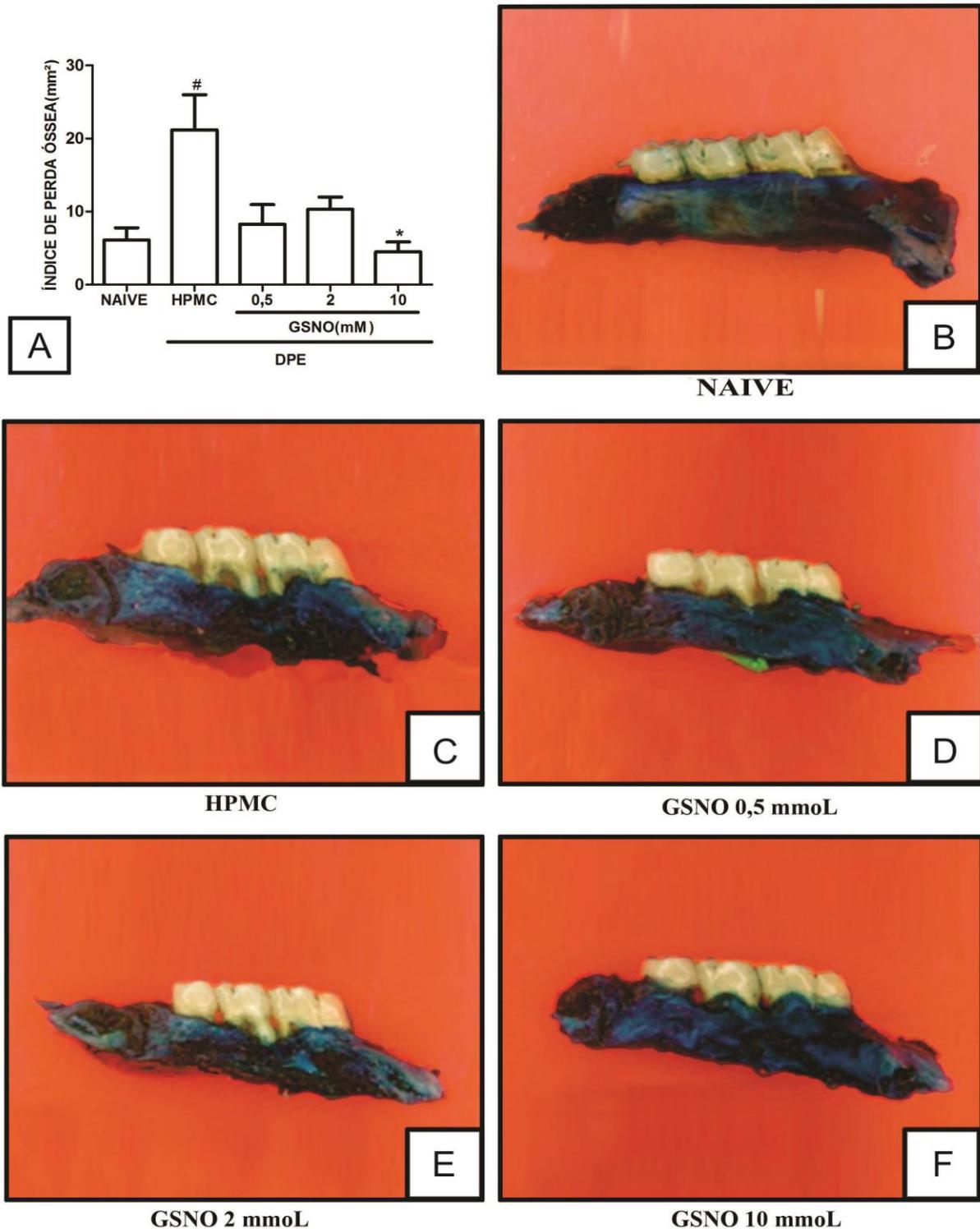
5 RESULTADOS

5.1 Efeito da administração tópica de S-nitrosoglutationa (GSNO) na perda óssea alveolar e no aspecto macroscópica da hemiarcada superior esquerda de ratos na doença periodontal experimental (DPE)

O grupo de animais com doença periodontal experimental (DPE) que receberam o veículo (HPMC) resultou em reabsorção óssea estatisticamente significante em relação ao grupo naive. Observou-se que o GSNO na concentração de 10 mM de GSNO apresentou redução significativa ($p < 0,05$) do índice de perda óssea quando comparado ao grupo com DPE tratado apenas com HPMC (Figura 7A).

A partir da avaliação macroscópica da hemiarcada superior de ratos submetidos à (DPE) observou-se no grupo tratado com HPMC (Figura 7C) intensa reabsorção óssea caracterizada por exposição das raízes, quando comparados ao grupo naive, sem DPE (Figura 7B). Os grupos tratados com GSNO na concentração de 0,5 (Figura 7D) e 10 mM (Figura 7F) apresentaram redução dos aspectos clínicos da doença periodontal, em relação ao grupo submetido a doença periodontal experimental (DPE).

Figura 7- Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o índice de perda óssea (IPO) em ratos Wistar submetidos à doença periodontal experimental (DPE) e aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais e de animais submetidos á doença periodontal experimental (DPE).



Fonte: Elaborado pela autora

A figura representa **A**. Índice de perda óssea: A aplicação de 10 mM de GSNO em animais com DPE foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar. **B**. Maxila de animal normal (naive). **C**. Maxila de animal com DPE no qual foi administrado o veículo (HPMC), observa-se exposição de raízes. **D**. Maxila de animal com DPE tratado com GSNO 0,5 mM. **E**. Maxila de animal com DPE tratado com GSNO 2 mM. **F**. Maxila de animal com DPE tratado com GSNO 10 mM. As barras representam a média \pm EPM no mínimo seis animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Naive.* $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

5.2 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos

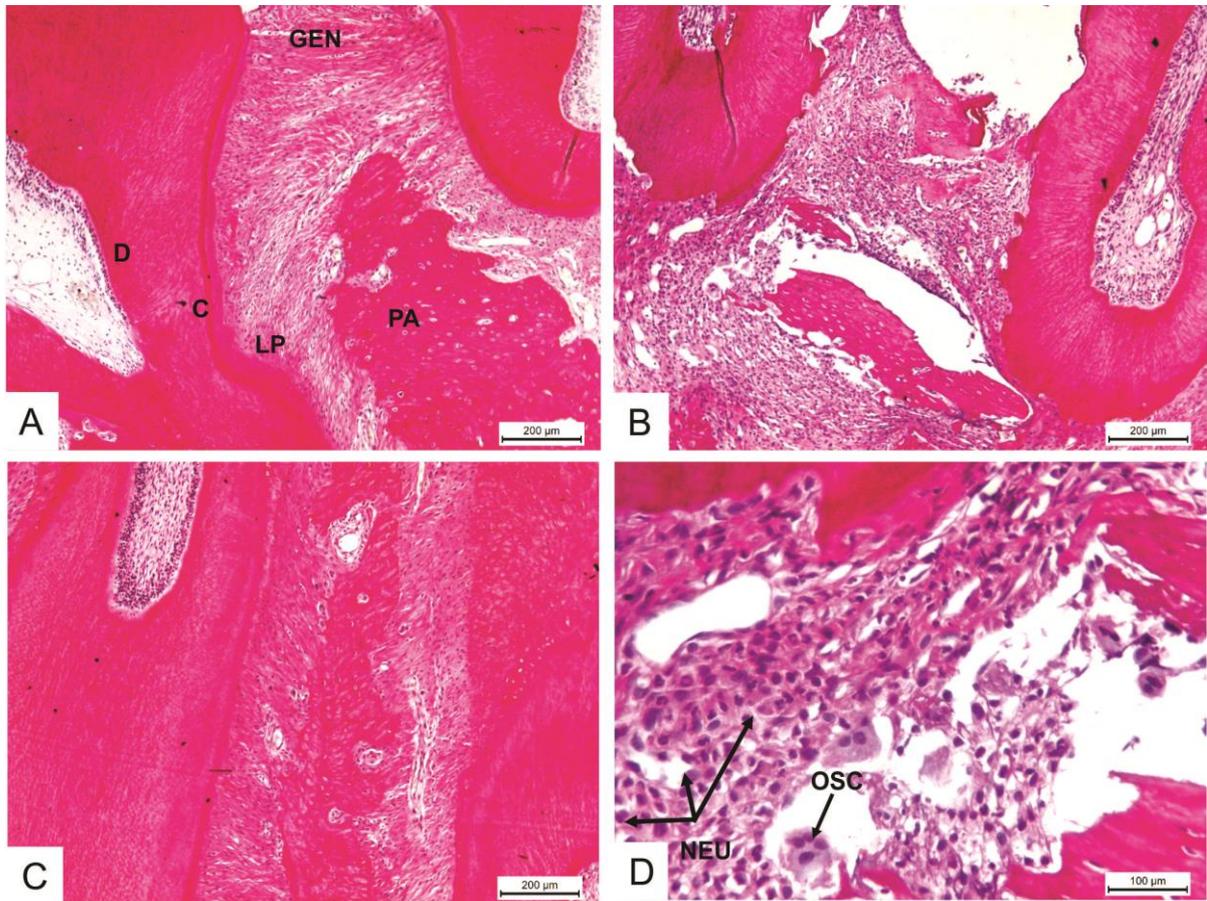
A análise histopatológica da região do periodonto entre primeiro e segundo molar dos animais submetidos a DPE, nos quais não foram administrados GSNO, revelou intenso infiltrado de células inflamatórias (Figura 8B) com predomínio de linfomonucleares e presença de neutrófilos (Figura 8D aumento 400x da figura B). Além disso, também observou-se perda óssea alveolar, degradação do cemento celular e acelular. Diferentemente, dos animais não submetidos à DPE (naive) que apresentaram estruturas do periodonto preservadas (Figura 8A). Aumento de 200x.

Quanto aos animais com DPE tratados com GSNO na concentração de 10 mM esses exibiram preservação do periodonto e ausência de infiltrado de células inflamatórias (Figura 8C). Aumento de 200x.

5.2.1 Tabela de escores histopatológicos

Os escores histopatológicos apresentaram redução significativa $n=6$ ($p < 0,05$) da lesão nos animais submetidos à DPE tratados com GSNO 10 mM, comparados aos animais com DPE tratados com HPMC (veículo). Nas demais concentrações de GSNO, 0,5 e 2 mM, houve redução do escore, porém não foi significativo (Tabela 2).

Figura 8 - Fotomicrografias do periodonto de animais submetidos à doença periodontal (DPE) que receberam HPMC (veículo), GSNO e de animal normal sem DPE na coloração de Picrosírius.



Fonte: Elaborado pela autora

Fotomicrografias corresponde **A**. Periodonto de animal naive, onde observa-se as seguintes estruturas: cemento (**C**), ligamento periodontal (**LP**), osso alveolar (**OA**) e gengiva (**GEN**). Também observa-se na imagem a dentina (**D**). **B**. Periodonto de animal tratado apenas com o veículo (HPMC). **C**. Periodonto de animal tratado com GSNO na concentração de 10 mM. E figura **D**. Aumento de 400x da imagem, **B** Observa-se infiltrado de células inflamatórias como neutrófilos (**NEU**) e osteoclastos (**OSC**). As barras representam a média \pm EPM., # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

Tabela 2 - Efeito do GSNO sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos

		DPE		
		GSNO		
Naive	HPMC	0,5	2	10
0 (0-0)	3 (3-3)#	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	1,5 (1-2)*

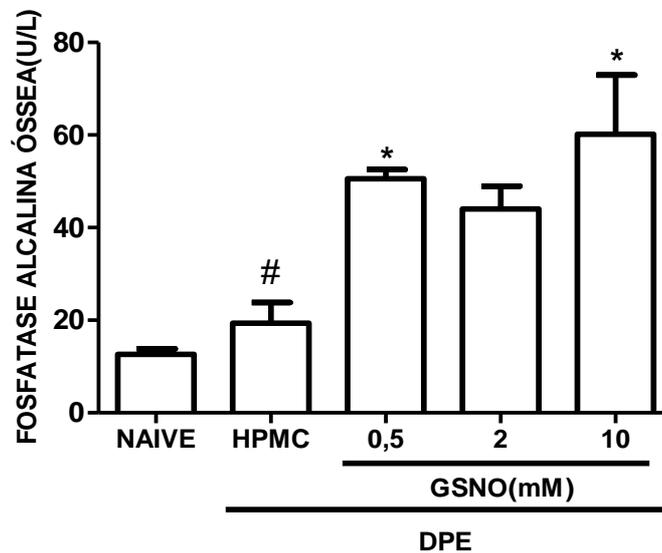
Fonte: Elaborado pela autora.

As regiões entre o 1º e o 2º molares foram consideradas para análise da presença de infiltrado celular inflamatório e da preservação do processo alveolar e cemento. Os resultados estão expressos como valores de mediana e variação. # $p < 0,05$, em relação ao controle naive, * $p < 0,05$, em relação ao controle HPMC (Kruskal-Wallis seguido de Dunns).

5.3 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina em ratos

Observou-se aumento dos níveis de fosfatase alcalina em todos os grupos em relação aos animais normais (NAIVE). Observa-se um aumento estatisticamente significativo nos grupos com DPE tratados com GSNO na concentração de 0.5 e 10 mM comparados ao grupo tratado com veículo, HPMC (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratos Wistar submetidos a doença periodontal experimental.



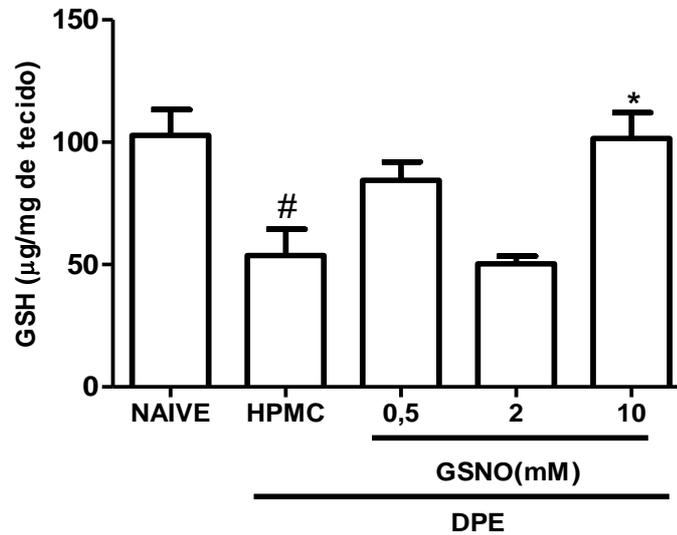
Fonte: Elaborado pela autora

Foi realizada a dosagem de fosfatase alcalina óssea a partir do sangue coletado no 11 dia após a indução da DPE. Observou-se aumento estatisticamente significativo dos níveis de fosfatase alcalina óssea em grupos tratados com GSNO na concentração de 0,5 e 10 mM em comparação ao grupo normal (naive) e HPMC. As barras representam média $n=6 \pm$ EPM. # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC e Naive (ANOVA, Bonferroni).

5.4 Efeito da administração tópica de S- nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis de GSH na gengiva de ratos

O grupo de animais com doença periodontal que receberam o veículo (HPMC) apresentou redução dos níveis de GSH quando comparado ao grupo de animais sem a doença (naive). A aplicação tópica de GSNO 10 mM em animais com DPE apresentou aumento estatisticamente significativo de GSH quando comparados ao grupo tratado com o veículo, HPMC (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) na gengiva de ratos Wistar submetidos á doença periodontal (DPE).



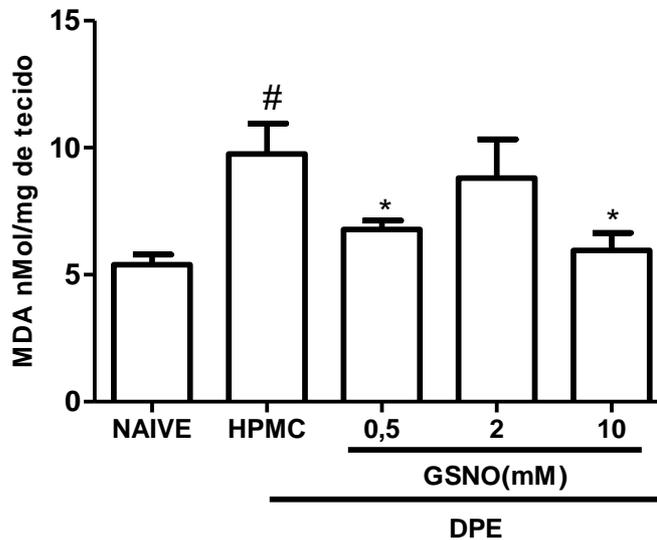
Fonte: Elaborado pela autora

Os níveis de GSH foi mensurado em gengivas de animais normais e com indução da doença periodontal experimental (DPE), nos quais GSNO (0,5 2 e 10 mM) ou HPMC (veículo) foram administrados topicamente 12/12 horas , durante 11 dias. O grupo naive não recebeu nenhum tratamento e não houve indução da DPE. Observou-se aumento de GSH nos animais tratados com GSNO na concentração de 10 mM em relação ao grupo tratado com HPMC. As barras representam média \pm EPM de 6 animais. # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

5.5 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em gengivas de ratos

No grupo de animais com DPE tratados com HPMC houve aumento dos níveis de MDA em relação ao grupo naive. Entretanto houve redução estatística nos grupos tratados com GSNO na concentração de 0,5 e 10 mM quando comparados ao grupo com DPE tratado com veículo, HPMC (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em gengivas de ratos.



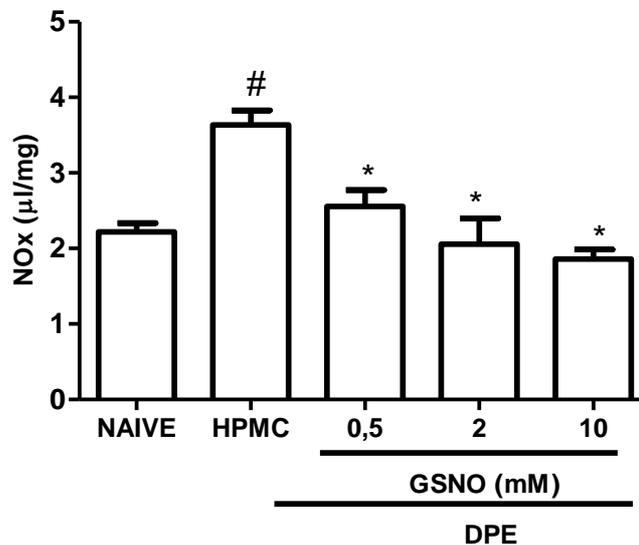
Fonte: Elaborado pela autora

Os níveis de malondialdeído (MDA) foram mensurados em gengivas de animais normais e com indução da doença periodontal experimental, nos quais GSNO (0,5, 2 e 10mM) ou HPMC (veículo) foi administrado topicamente 12/12 horas, durante 11 dias. O grupo naive não recebeu nenhum tratamento e não houve indução da DPE. Observou-se redução significativa de MDA nos animais tratados com GSNO na concentração de 0,5 e 10 mM em relação ao grupo tratado com HPMC. As barras representam média \pm EPM de 6 animais. # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

5.6 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE)

A dosagem de nitrito/nitrato (NOx) é utilizada como indicador da produção de NO. Os animais que receberam GSNO (0,5, 2 ou 10mM), apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na dosagem de NOx quando comparados aos animais pertencentes aos grupos submetidos a DPE tratado, com HPMC (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE).



Fonte: Elaborado pela autora.

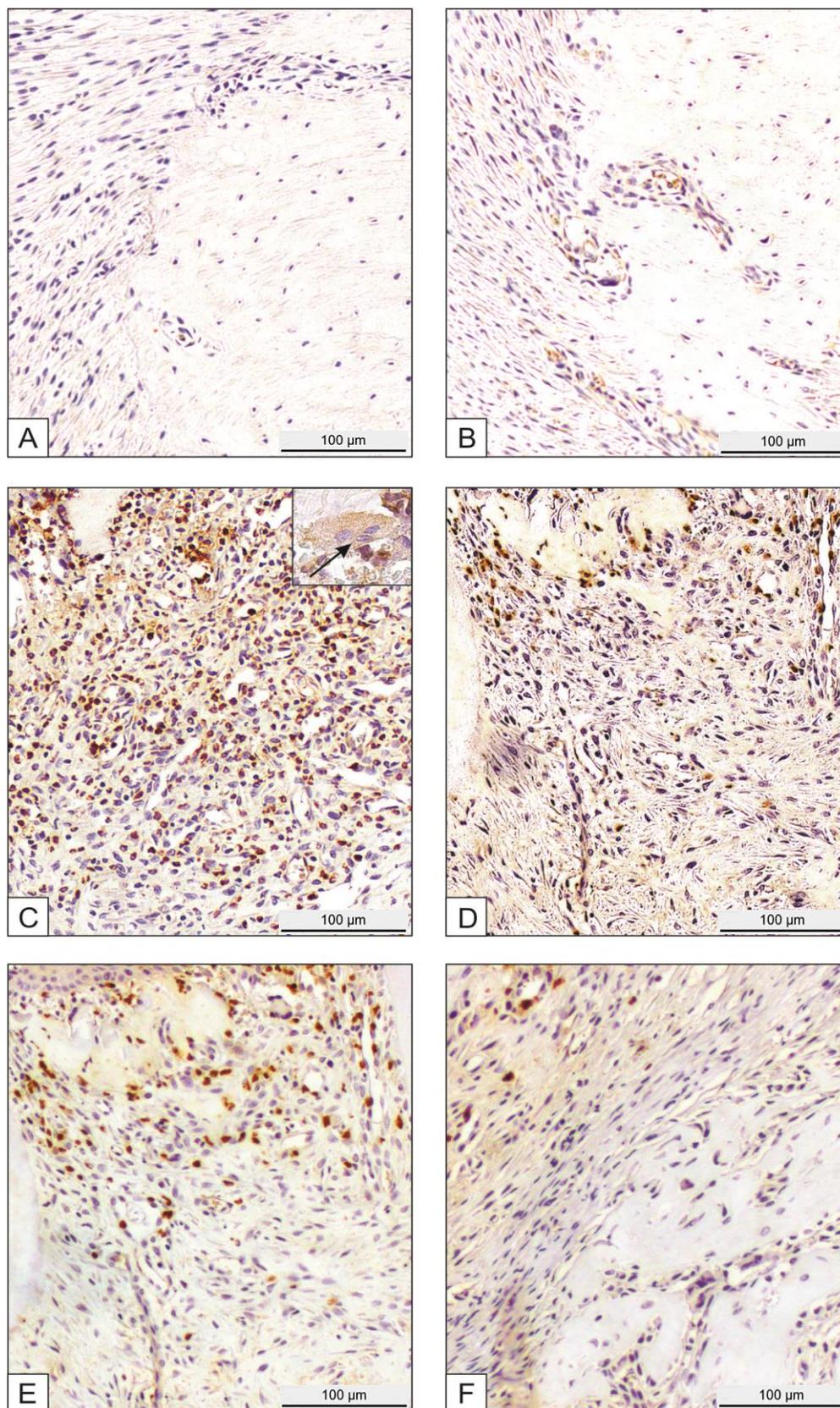
Os níveis de nitrito/nitrato (NOx) foram dosados em homogenatos de gengivas de animais tratados com GSNO (0,5, 2, ou 10 mM) ou (HPMC) e submetidos a doença periodontal experimental (DPE). O grupo naive não foi submetido a DPE e não recebeu nenhum tratamento e não houve indução da DPE. As gengivas foram removidas para dosar nitrito/nitrato (NOx) pelo método de Griees. Observa-se redução estatisticamente significativa da concentração de NOx nos grupos com DPE tratados com GSNO 0,5, 2, 10mM em relação aos animais tratados com o veículo (HPMC). As barras representam média \pm EPM. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC, * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

5.7 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de iNOS no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE)

Observou-se expressivo número de células marcadas para iNOS nos animais submetidos a DPE tratados com HPMC (Figura 13C). Dentre as células positivas para iNOS, nota-se que além de células do infiltrado inflamatório (neutrófilos e mononucleares), também há osteoclastos positivos para essa enzima. O tratamento com GSNO diminuiu as marcações para iNOS, porém apenas a concentração de 10 mM apresentou redução considerável (Figura 13F).

O controle negativo (Figura 13A) não apresenta nenhuma marcação para iNOS, validando dessa forma as marcações evidenciadas, uma vez que esse controle não é incubado com anticorpo primário, e sim com diluente.

Figura 13 - Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase (NOSi) no periodonto de animais normais e de animais submetidos a DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10 mM.



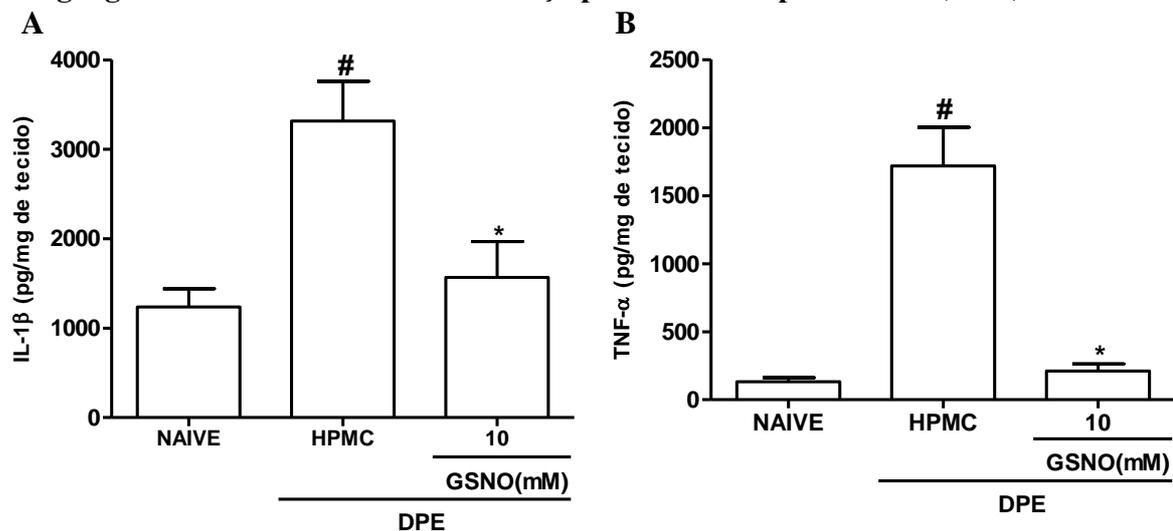
Fonte: Elaborado pela autora.

A figura (A) representa controle negativo, a marcação para iNOSi foi realizada na gengiva obtida dos grupos naive (B), HPMC (C), GSNO 0,5 mM (D), GSNO 2 mM (E), GSNO 10 mM (F). Células marcadas positivamente são claramente observadas nas hemimaxilas retiradas do grupo HPMC com osteoclastos marcado (C) seta. Aumento de 1000x enquanto que uma diminuição da marcação foi observada nos espécimes provenientes dos ratos tratados com GSNO 0,5 figura (D) e 10 mM figura (F). Aumento original 200x.

5.8 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) em gengivas de ratos

A análise da concentração de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , em determinado tecido ou fluido são marcadores de inflamação. Nas gengivas dos animais tratados apenas com o veículo houve aumento estatisticamente significativo em relação ao controle (NAIVE) tanto de IL-1 β (Figura 14A) como TNF- α (Figura 14B). Enquanto os animais tratados com GSNO na concentração de 10 mM apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) dessas citocinas pró-inflamatórias comparados aos tratados com o veículo (HPMC).

Figura 14 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de IL-1 β e TNF- α na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE).



Fonte: Elaborado pela autora.

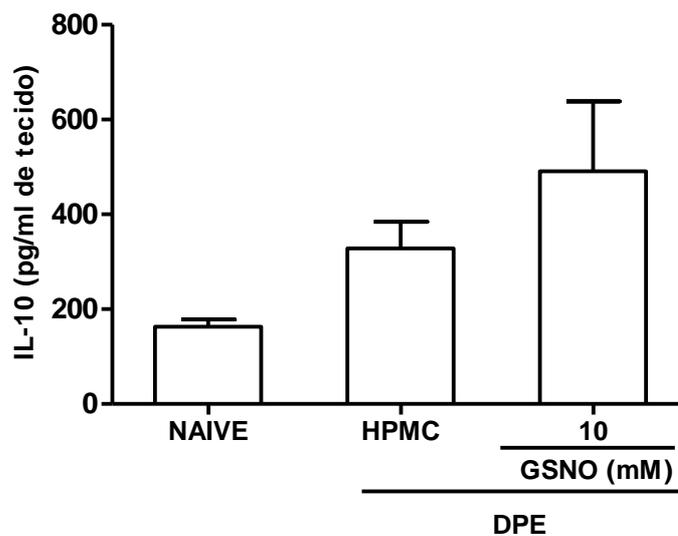
Os animais foram sacrificados no 11 $^{\circ}$ dia. As gengivas foram removidas para quantificar a IL-1 β (A) e TNF- α (B). A concentração de IL-1 β em pg/mg de tecido da gengiva: observa-se redução significativa da concentração de IL-1 β nos animais tratados com GSNO na concentração de 10 mM em relação aos tratados com o veículo (HPMC) B. Concentração de

TNF- α em pg/mg de tecido/gengiva. Há redução estatisticamente significativa nos animais tratados com GSNO na concentração de 10 mM em relação aos animais tratados apenas com HPMC (veículo). As barras representam média \pm EPM de 6 animais. # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive, * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC (ANOVA, Bonferroni).

5.9 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de citocina anti-inflamatória (IL-10) em gengivas de ratos

A análise da concentração de IL-10, em determinado tecido ou fluido é um marcador de atividade anti-inflamatória. O tratamento com GSNO (10 mM) propiciou o aumento de IL-10 em relação aos demais grupos, porém essa elevação não foi significativa.

Figura 15 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de IL-10 na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram sacrificados no 11º dia. As gengivas foram removidas para quantificar a IL-10. A concentração de IL-10 em pg/mg de tecido da gengiva. Observa-se aumento de IL-10 nos animais tratados com GSNO na concentração de 10 mM. Há uma redução de IL-10 nos grupos tratados com veículo (HPMC). As barras representam média \pm EPM (ANOVA, Bonferroni) 6 animais por grupo.

5.10 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a expressão gênica de TNF- α , RANK, RANK-L/OPG em gengivas de ratos

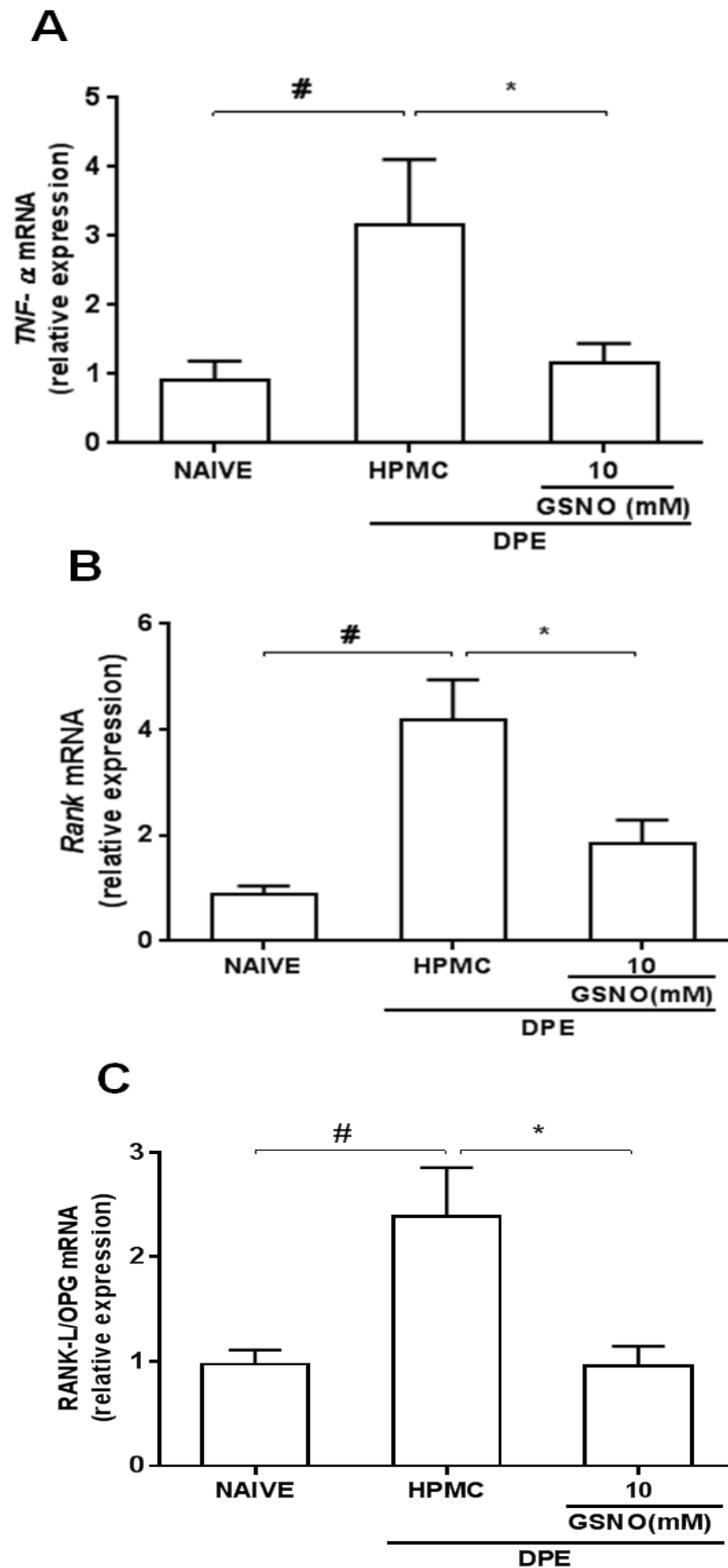
Os genes associados ao processo inflamatório (TNF- α) e metabolismo ósseo (RANK e RANK-L/OPG) foram avaliados e encontram-se expressos em todos os grupos deste estudo (Figura 16).

A expressão gênica relativa de TNF- α apresentou-se aumentada de forma significativamente ($p < 0,05$) no grupo com DPE, que recebeu o veículo HPMC, em relação ao grupo controle (naive). O tratamento com GSNO 10 mM preveniu esse aumento (Figura 16 A).

Quanto à expressão de fatores associados ao metabolismo ósseo, os animais tratados com GSNO (10 mM) exibiram redução estatisticamente significativa na transcrição gênica de RANK comparada ao grupo com DPE tratados apenas com o veículo, HPMC (Figura 16B).

Na avaliação da razão da expressão gênica de RANK-L/OPG (Figura 16C), houve aumento significativo ($p < 0,05$) dessa relação nos animais submetidos à DPE tratados apenas com o veículo (HPMC). O tratamento com GSNO na concentração de 10 mM foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) essa razão.

Figura 16 - Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a expressão gênica de TNF- α , RANK e RANK-L/OPG na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal



experimental (DPE).

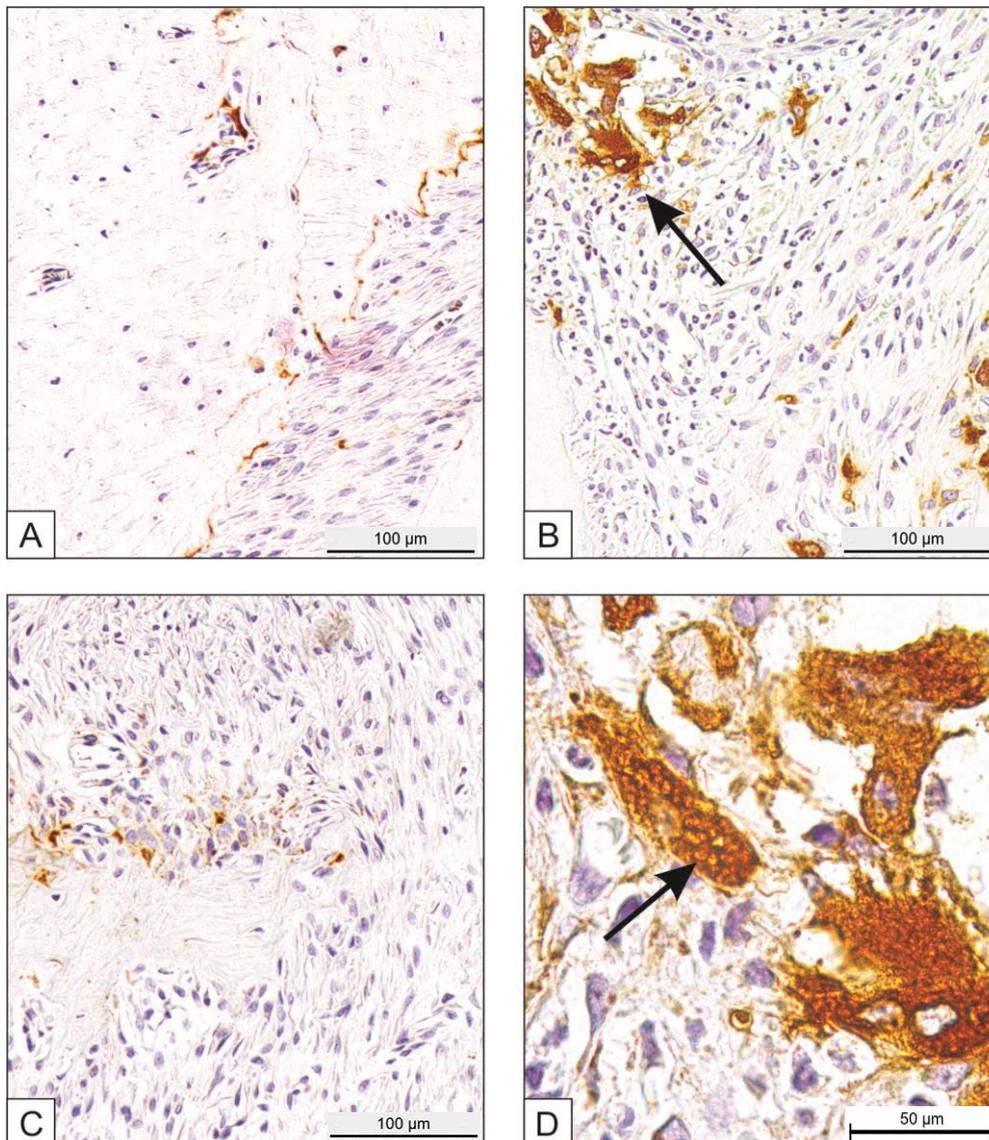
Fonte: Elaborado pela autora.

A expressão gênica relativa foi avaliada em gengiva de animais submetidos a DPE e tratados com GSNO (10 mM) ou HPMC. O grupo naive não foi submetido à DPE e a nenhum tratamento. **A.** Expressão gênica relativa de TNF- α : observa-se redução estatisticamente significativa nos grupos tratados com GSNO na concentração de 10 mM comparados aos grupos com DPE tratados com o veículo (HPMC). **B.** Expressão gênica relativa de RANK: O grupo com DPE tratado apenas com o veículo apresentou aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo naive, enquanto o grupo tratado com GSNO apresentou redução significativa da expressão de RANK comparado ao grupo HPMC. **C.** Expressão gênica relativa da razão RANK-L/OPG: houve redução significativa da razão da expressão gênica de RANK-L/OPG nos grupos tratados com GSNO na concentração de 10 mM. As barras representam a média \pm EPM. # $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e * $p < 0,05$ em relação ao grupo HPMC. (ANOVA, Bonferroni).

5.11 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre à imunomarcação de TRAP no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE)

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é um marcado de osteoclastos em processo de reabsorção óssea. Observou-se uma acentuada marcação para TRAP nas células do ligamento periodontal, especialmente nos osteoclastos (Figura 17D) (setas), aumento de 1000x dos animais submetidos à DPE que receberam HPMC (Figura 17B) em relação as marcações observadas no grupo naive (Figura 17A). A imunohistoquímica também evidenciou que o tratamento com GSNO 10 mM (Figura 17C) diminui a marcação de células positivas para TRAP no periodonto dos animais que foram induzida a DPE.

Figura 17 - Imunohistoquímica para TRAP no periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10mM.



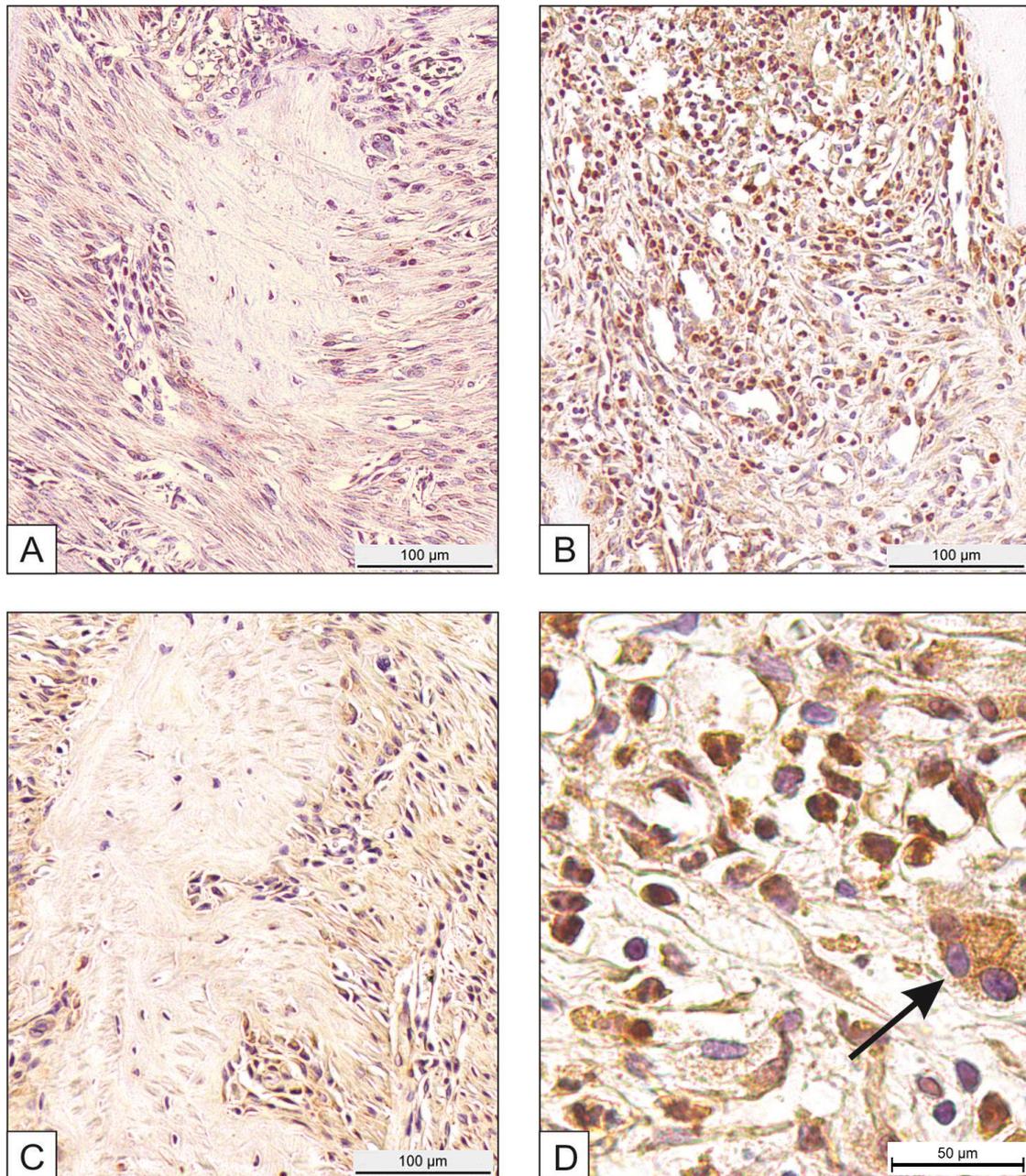
Fonte: Elaborado pela autora.

GSNO 0,5, 2 ou 10 mM, foi administrado localmente, diariamente durante 11 dias após a indução da DPE. **A.** Periodonto de animal sem DPE (naive), mostrando diminuição de imunomarcacão, **B.** Periodonto de animal submetido à DPE que recebeu HPMC mostrando células positivas marcadas para Trap, **C.** Periodonto de animal submetido à DPE, que recebeu GSNO 10 mM, mostrando uma diminuição de imunomarcacão para TRAP. **D.** Aumento de 1000x da figura 17B, (seta) e marcação de osteoclasto. A, B, C aumento de 200x.

5.12 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de RANK no periodonto de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)

Observou-se acentuada marcação de imunohistoquímica para RANK nas células do ligamento periodontal nos animais submetidos à DPE, tratados com HPMC (Figura 18B). Ao analisar as células marcadas, nota-se que além de osteoclastos, também outras células do ligamento periodontal encontram-se imunomarcadas como células linfomocleadas (Figura 18D). Aumento de 1000x. Contudo, observou-se poucas células positivas para RANK nos animais tratados com GSNO 10 mM, aos quais foram submetidos a DPE (Figura 18C).

Figura 18 - Imunohistoquímica para RANK no periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10 mM.

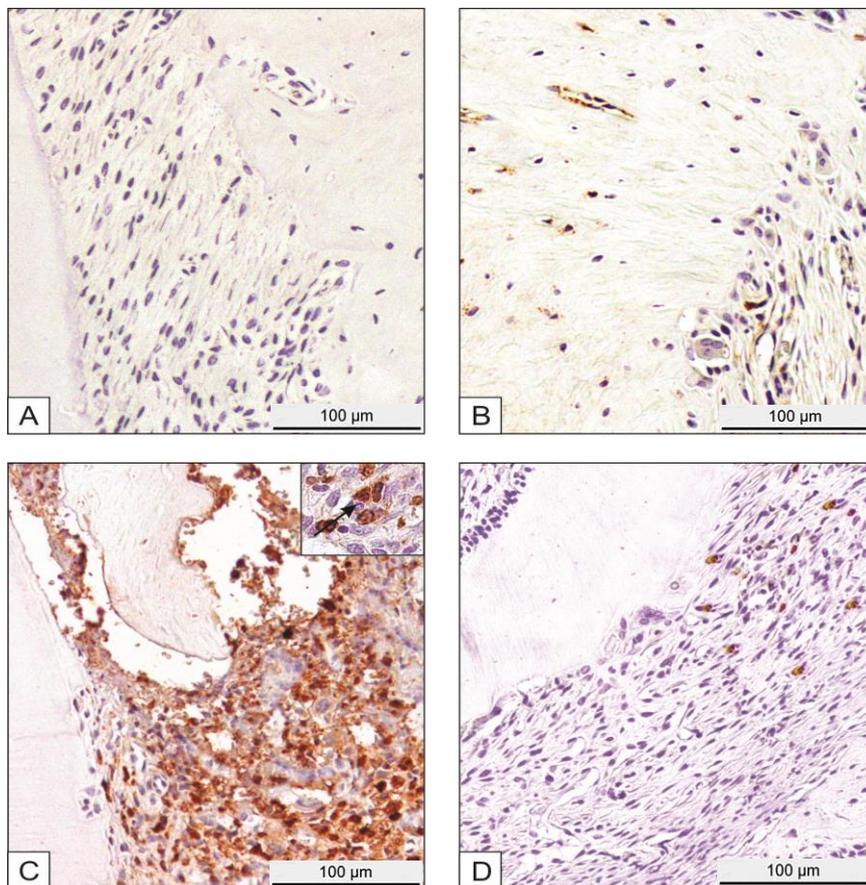


O GSNO 0,5, 2 ou 10 mM, foi administrada localmente e diariamente em 12/12 horas durante 11 dias após a indução da DPE. **A.** Periodonto de animal sem DPE, mostrando ausência de imunomarcção; **B.** Periodonto de animal submetido à DPE que recebeu HPMC mostrando intensa marcação de polimorfonucleares e osteoclastos (seta) **D.** Aumento original de 1000x da figura **B.** **C.** Periodonto de animal submetido à DPE, que recebeu GSNO 10 mM, mostrando uma diminuição de imunomarcção para RANK. A Aumento original de 200x.

5.13 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de RANK-L no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE)

A imunohistoquímica para RANK-L mostrou acentuado aumento da expressão do ligante RANK-L no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental, grupo HPMC (Figura 19C) com aumento de 1000x (seta) em comparação ao observado no grupo naive (Figura 19B). Também se observou que o tratamento com GSNO (10 mM) localmente foi capaz de reduzir a imunomarcção de RANKL no periodonto de ratos submetidos à DPE (Figura 19D).

Figura 19 - Imunohistoquímica mostrando a marcação de RANK-L nos tecidos gengivais de ratos submetidos à DPE e tratados com GSNO.



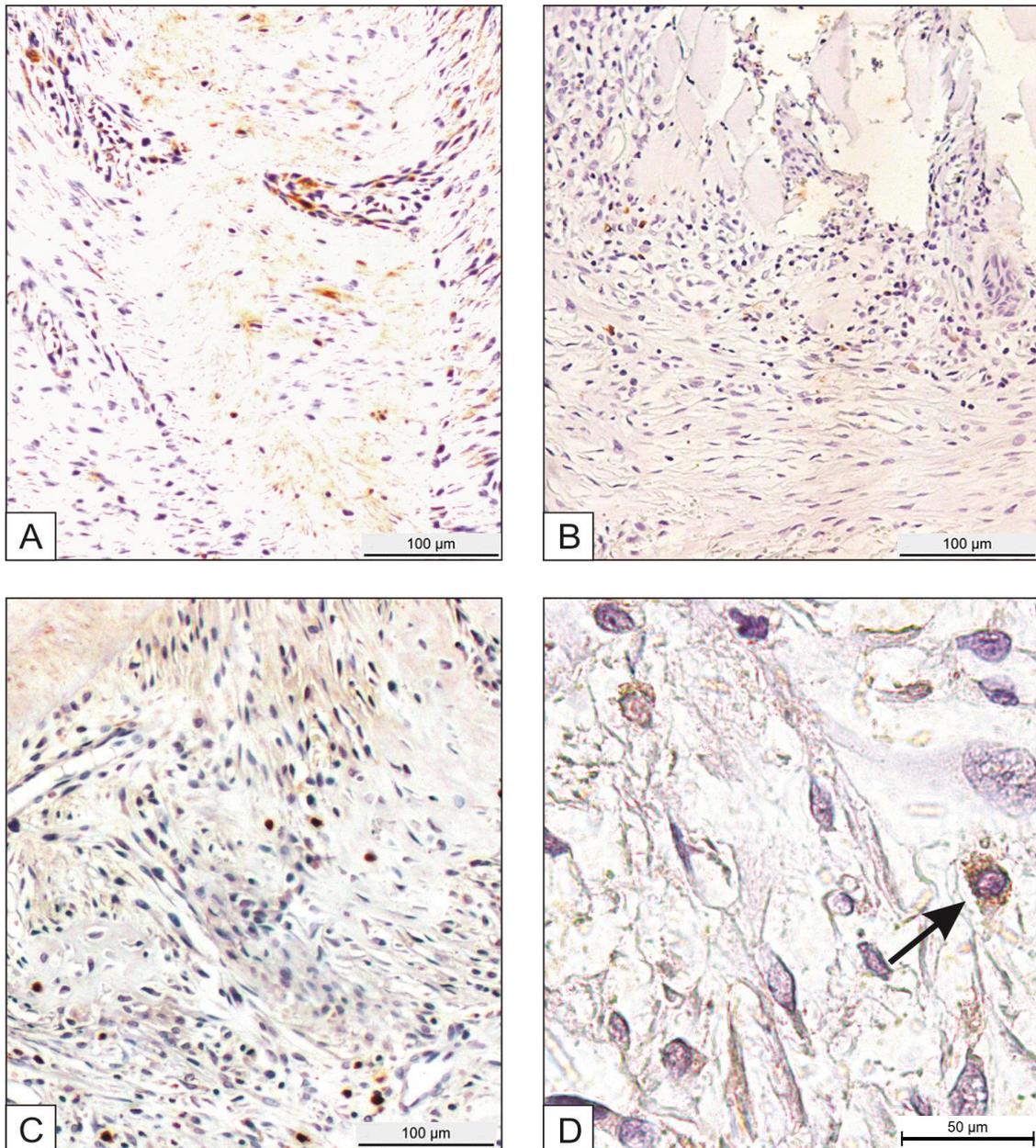
Fonte: Elaborado pela autora

(A) representa controle negativo da imunohistoquímica, marcação para RANK-L foi realizada no periodonto obtido dos grupos naive (B), HPMC (C) e GSNO 10 mM (D) Células marcadas positivamente para RANK-L são observadas no grupo HPMC (C), enquanto que pouca marcação foi observada nas espécimes provenientes dos ratos tratados com GSNO 10 mM (D). As fotomicrografias menores representam uma área com aumento de 1000x (seta) apontando osteoclastos (Figura C). A, B, C fotomicrografias aumento de 200x.

5.14 Efeito do S-nitrosuglutationa (GSNO) sobre a imunomarcação de OPG no periodonto de ratos submetidos á doença periodontal experimental (DPE)

Apesar da pouca expressividade das células positivas para OPG em todos os grupos avaliados, Observa-se aumento das imunomarcação no grupo tratado com GSNO 10 mM (Figura 20D). Dentre as células marcadas no periodonto, há marcação de osteoblastos (Figura 20D). Aumento 1000x.

Figura 20 - Imunohistoquímica para OPG no periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam HPMC ou GSNO 10 mM.



Fonte: Elaborado pela autora.

A marcação para OPG foi realizada no periodonto obtido dos grupos naive (**A**), HPMC (**B**) e GSNO 10 mM (**C**) células marcadas positivamente para OPG são observadas no grupo GSNO 10 mM (**C**), enquanto que pouca marcação foi observada nas espécimes provenientes dos ratos tratados com HPMC (**B**). As figuras A, B, C representam aumento de 200x, exceto a figura D aumento de 1000x da figura C mostrando osteoblasto marcado.

6 DISCUSSÃO

Os nossos dados experimentais mostraram que a aplicação tópica do gel de GSNO em matriz mucoaderente (HPMC) na concentração de 10 mM resultou na redução da perda óssea, aumentou a fosfatase alcalina, diminuiu parâmetros inflamatórios, o stress oxidativo, e reduziu a expressão gênica de RANK, TNF- α , bem como a razão entre a expressão gênica de RANKL/OPG na doença periodontal experimental.

Diversas terapêuticas tem sido testadas na doença periodontal experimental. Araújo Junior *et al.* (2013) mostraram que a atorvastatina diminui a perda óssea alveolar, inflamação e estresse oxidativo na DPE. Dalcico *et al.* (2013) evidenciou que a sinvastina previne a reabsorção óssea alveolar. Tamaki *et al.* (2014) demonstraram que o resveratrol melhorou o estresse oxidativo e preveniu a progressão da periodontite em modelo de doença periodontal (DP). Leitão *et al.* (2004) evidenciou que a aplicação local de isosorbida, doador de óxido nítrico, diminuiu a reabsorção óssea na periodontite experimental em ratos. Dentre estas terapêuticas, os doadores de óxido nítrico tem demonstrado um papel promissor na prevenção de eventos patogênicos da doença periodontal (DP).

Em um estudo recente do nosso grupo, Menezes *et al.* (2012) demonstraram que o GSNO administrado por via intragengival em matriz de PVP (Polivinil Pirrolidona) foi eficaz na redução da inflamação e reabsorção óssea alveolar. Diante dos benefícios do GSNO aplicado intragengival, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do GSNO, aplicado localmente no periodonto de ratos com DPE, nos parâmetros inflamatórios, no estresse oxidativo e na expressão gênica de mediadores inflamatórios e do metabolismo ósseo. Para tal foi utilizado um modelo de doença periodontal experimental padronizado anteriormente (KOIDE *et al.*, 1995), ao qual foi modificado no laboratório de Farmacologia da Inflamação do Câncer, LAFICA (LEITÃO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2000). O modelo consiste na inserção do fio de náilon 3.0 ao redor do segundo molar superior esquerdo com apenas um nó deixado na face vestibular por 11 dias. Esse modelo caracteriza-se por aumento do infiltrado de células inflamatórias, que leva a destruição do ligamento periodontal, osso alveolar e cimento.

Nesse contexto, o modelo de doença periodontal utilizado neste estudo foi eficaz, uma vez que esses aspectos foram identificados nos animais tratados com o veículo (HPMC). Desta forma o modelo utilizado reproduziu as principais características da periodontite em humanos sendo apropriado para este estudo, (MENEZES *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2000).

No presente trabalho observou-se uma significativa perda óssea no 11º dia após a indução da DPE nos animais tratados com o HPMC (veículo). A análise histopatológica desse grupo com DPE evidenciou infiltrado de células inflamatórias, perda da integridade do cimento e reabsorção óssea alveolar. Corroborando com os dados dessa dissertação Menezes *et al.*(2012) , mostraram que a doença periodontal (DPE) envolve o recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas, e diferenciação de osteoclastos, o que leva reabsorção óssea e perda de inserção (MENEZES *et al.*, 2012).

O GSNO mostrou-se efetivo não somente para a redução da perda óssea alveolar, mas também no aumento de fosfatase alcalina encontrado ao se tratar com a maior concentração que sugere aumento neoformação óssea. Além disso, nesse grupo de animais não foi observado exposição de raízes, sendo um importante indicador macroscópico de inibição da perda óssea.

Esses achados estão de acordo com Percival *et al.* (1999), o qual evidenciaram que o GSNO tem efeito inibitório na reabsorção óssea, devido a inibição de catepsina K, enzima altamente expressa em osteoclastos, *in vitro*. Assim considerando que o GSNO é um doador de NO, poderia também atuar na atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos podendo ter um efeito estimulatório e inibitório na remodelação óssea dependendo dos níveis de NO e do modelo utilizado (ALAYAN *et al.*, 2006).

Nesse contexto, apenas na concentração de GSNO 10 mM foi capaz de inibir a perda óssea no presente estudo. Esse efeito do GSNO nessa concentração mostra que concentrações mais elevadas de GSNO, através de liberação lenta de NO, permitida pela matriz utilizada, HPMC suprime a formação e atividade dos osteoclastos, inibindo com isso a reabsorção óssea (KENDAL *et al.*, 2001; RALSTON *et al.*, 1995; MACINTYRE *et al.*, 1991). Nossos achados estão de acordo com outros estudos que utilizaram doadores de óxido nítrico encontrando de forma semelhante redução de perda óssea (LEE *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2012; LEITÃO *et al.*, 2005).

Lee *et al.* (2009), demonstraram que a atividade da fosfatase alcalina aumentou depois da exposição com nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico. A liberação de óxido nítrico estimulada por nitroprussiato de sódio foi acompanhada por uma inibição do crescimento de células e um aumento nos níveis de fosfatase alcalina em células do ligamento periodontal em humanos.

Menezes *et al.* (2011), também exploraram o papel do GSNO na DPE, sendo que aplicado intragengivalmente, e seus resultados mostraram aumento da fosfatase óssea, quando administrado GSNO na concentração de 2 mM. Diferentemente, neste estudo a melhor

concentração de GSNO que induziu aumento significativo de fosfatase alcalina foi a concentração de 10 mM. Essa diferença pode possivelmente ser atribuída a via de administração e a diferença entre a matriz utilizada (PVP ou HPMC).

Nessa concentração, outro efeito importante do GSNO foi a redução do MDA. Esse efeito indica que o GSNO regula a via de sinalização do estresse oxidativo. Ainda neste grupo observou-se aumento do GSH e redução dos níveis de NO_x no tecido gengival. Os resultados desses parâmetros analisados indicam que o GSNO reduz o estresse oxidativo presente na patogênese da doença periodontal. Estes resultados corroboram com os achados do estudo realizado por Menezes *et al.* (2012).

Esse efeito do GSNO já foi estudado por Rosales *et al.* (2014), entretanto foi analisado em contexto diferente da DPE, em que foi avaliado o mecanismo do GSNO em colírios na redução do estresse nitrosativo na retinopatia diabética experimental. Esses autores propuseram que o GSNO preveniu o estresse nitrosativo devido a redução da produção de óxido nítrico por via inibição de iNOS por S-glutationilação.

Em ratos a expressão de iNOS foi evidenciada em macrófagos, linfócitos e neutrófilos, enquanto em humanos foi em macrófagos, células endoteliais e polimorfonucleares (BATISTA *et al.*, 2002; LAPPIN *et al.*, 2000; LOHINAI *et al.*, 1998). Em condições inflamatórias, há uma grande produção de óxido nítrico via iNOS. Esse aumento de óxido nítrico causa aumento do infiltrado de células inflamatórias e aumento da permeabilidade vascular. Além de promover a degradação de fibras colágenas mediadas por MMP (ALAYAN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2003), o NO também contribui para a infrarregulação de inibidores de metaloproteinases (BRENNAN, 2003).

Neste estudo verificamos menor número de células positivas para iNOS nos animais tratados com GSNO. Adicionalmente, houve redução da produção de NO_x nesse grupo. Esses resultados encontrados nesse estudo propõe que há uma inibição da produção de óxido nítrico catalisado pela iNOS. Essas observações foram ao encontro às feitas por Herrera *et al.* (2011), onde demonstrou-se que a administração de aminoguanidina, inibidor seletivo de iNOS, por via oral na DPE, inibiu a perda óssea alveolar, assim como reduziu a inflamação e necrose do ligamento periodontal.

De forma contraditória, em outro estudo, em que o nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico que foi utilizado em células do ligamento periodontal em estudo *in vitro* e foi observada a sua relação com a diferenciação dos osteoblastos, observou-se aumento da expressão de iNOS e produção de óxido nítrico nas células de ligamento periodontal (LEE *et*

al., 2009). Esses dados sugerem os possíveis efeitos negativos do óxido nítrico quando utilizados em maiores concentrações.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão implicadas na destruição dos tecidos durante a fase inflamatória, sendo o estresse oxidativo um importante fator da patogênese da periodontite. Diferentes mecanismos podem causar dano tecidual através das ROS, incluindo dano ao DNA, peroxidação lipídica, dano protéico, oxidação enzimática e estimulação de citocinas inflamatórias (GRANT *et al.*, 2010). Portanto, o fato do GSNO ter diminuído o estresse oxidativo no presente estudo pode ser um fator importante para explicar o seu efeito protetor sobre o periodonto. Esse efeito foi acompanhado pelo aumento de GSH. A glutatona reduzida (GSH) é o principal antioxidante intracelular, a qual é importante em muitas funções biológicas, tais como prevenção do dano oxidativo, remoção de hidroperóxidos e desintoxicação e estabilização das membranas biológicas (PANJAMURTHY *et al.*, 2005). Tamaki *et al.* (2014) propuseram que o resveratrol tem propriedades antioxidantes devido à capacidade de eliminar superóxido hidroxil e peróxido nítrico (eliminação de ROS) em ratos com periodontite experimental induzida. Ainda nesse estudo sugeriram que a resposta imune foi importante fonte para o estresse oxidativo e causou degradação do periodonto.

Inicialmente, foram administradas diferentes concentrações de GSNO, devido a dualidade do efeito dos doadores de óxido nítrico e para estabelecer a melhor dose a ser utilizada na avaliação dos parâmetros. Neste estudo as concentrações de 0,5 e 2 mM apresentaram efeitos distintos em diferentes parâmetros avaliados, porém a análise dos parâmetros em conjunto não mostraram melhora significativa da DPE. Devido à alta significância dos achados na concentração de 10 mM, deu-se continuidade na avaliação dos demais parâmetros apenas nessa concentração.

Em nosso estudo, verificamos que o tratamento da DPE com GSNO, na concentração avaliada, diminuiu a produção de IL-1 β e TNF- α . Já é bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , estimulam o recrutamento de leucócitos para o tecido gengival devido a sua capacidade de aumentar o número de moléculas de adesão de leucócitos no endotélio vascular, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas (NEWTON; DIXIT, 2012). Em adição, essas citocinas também estimulam a produção de quimiocinas induz a expressão de outros mediadores inflamatórios que potencializam a resposta inflamatória como as prostaglandinas e metaloproteinases (GRAVES; COCHRAN, 2003). Nossos dados corroboram com essa observação, uma vez que os animais com DPE tratados

com GSNO apresentaram redução do infiltrado de células inflamatórias com concomitante diminuição de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso o GSNO inibe a inflamação tecidual através de S-nitrosilação de NF- κ B, resultando na supressão de NF- κ B, com isso há inibição das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α e diminuição de moléculas de adesão celular endoteliais, as quais promovem infiltração leucocitária (SAVIDGE *et al.*, 2007; PANNU; SINGH, 2006; KHAN *et al.*, 2005).

Vale salientar que IL-1 β e TNF- α estão presentes no tecido gengival dos animais com doença periodontal e são capazes de induzir a expressão de RANK-L por osteoblastos (TANAKA; NAKAYAMADA; OKADA, 2005). Neste estudo, houve relação direta da expressão gênica de TNF- α e RANK detectada por qPCR, sendo que o GSNO na concentração de 10 mM reduziu a expressão proteica de RANK assim como reduziu a expressão gênica de TNF- α .

Kawai *et al.* (2006) explorou as fontes de RANK-L na doença periodontal (DP). Em sua pesquisa comparou a gengiva de pacientes saudáveis com as de pacientes com doença periodontal (DP). Os autores observaram em seus achados que além dos osteoblastos, os linfócitos T e B também são fontes de RANK-L na doença periodontal (DP). A imunohistoquímica apresentada aqui também demonstra a expressão de RANK-L por células do conjuntivo do ligamento periodontal. Esses autores evidenciaram também uma relação entre a concentração de RANK-L e IL-1 β , uma vez que ambas estavam elevadas em pacientes com doença periodontal (DP). Neste mesmo estudo a produção de OPG, quando comparados aos dois grupos de pacientes estudados, não mostrou significância. Em nosso estudo, o GSNO estimulou o aumento da expressão gênica de OPG.

Fan *et al.* (2004) mostrou em seu estudo que o NO diminuiu a expressão de RANK-L em células do estroma da medula óssea *in vitro* enquanto que aumentou OPG reduzindo assim o potencial osteoclastogênico.

Em acréscimo a esse achado, a imunohistoquímica apresentada neste trabalho mostrou aumento de células marcadas positivamente para OPG no periodonto desses animais.

RANK/RANK-L/OPG apresentam papel crítico na regulação do metabolismo ósseo. Essa via é essencial para o controle da atividade dos osteoclastos (KOIDE *et al.*, 2010). Muitas citocinas contribuem para o aumento da expressão de RANK-L. Este encontra-se aumentado nos tecidos periodontais inflamados (CROTTI *et al.*, 2003).

A IL-1 β induz a osteoclastogênese e a reabsorção óssea, na maioria das vezes por suprarregulação de RANK e RANK-L, enquanto isso o TNF- α estimula a osteoclastogênese

direta ou indiretamente via RANK-L (WEI *et al.* 2005). Essa suprarregulação de RANK-L induzida pela IL-1 β ocorre de forma indireta. IL-1 β estimula os fibroblastos e osteoblastos a liberarem prostaglandinas PGE₂, que por sua vez induz o aumento da expressão de RANK-L (AKAOGI *et al.*, 2006). Nosso estudo evidenciou um aumento de liberação de IL-1 β e TNF α no tecido gengival que é reduzida pela aplicação tópica de GSNO 10 mM.

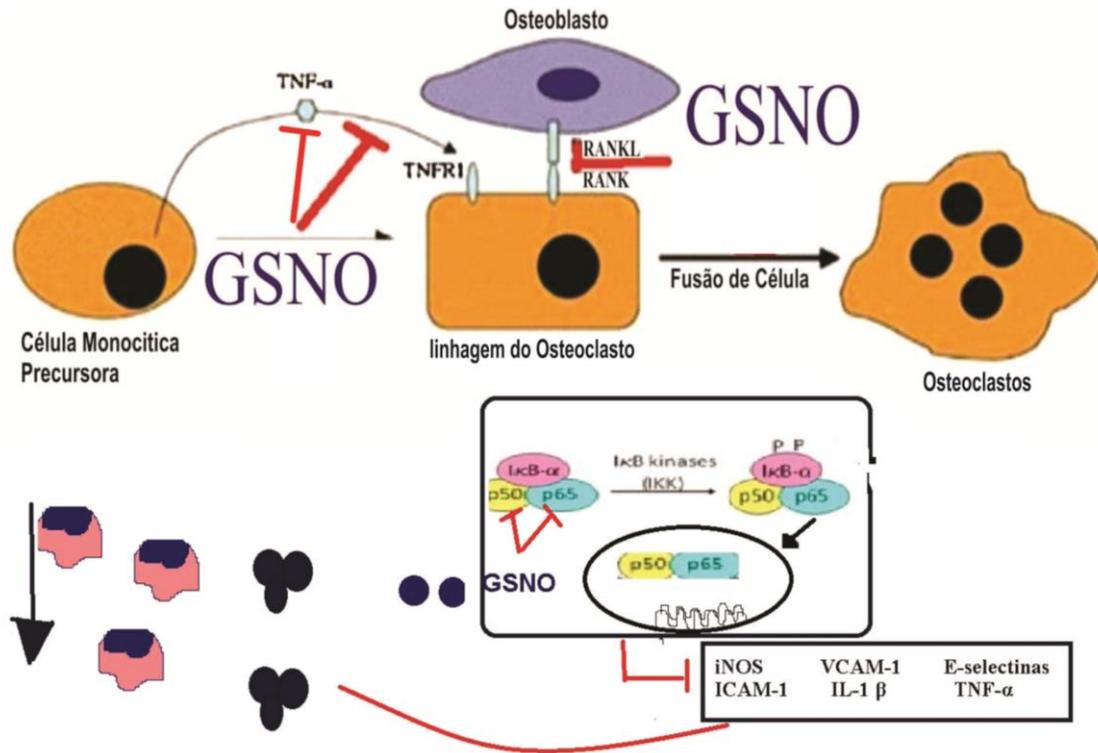
A razão da expressão gênica de RANK-L/OPG encontra-se aumentada em lesões, com processo de destruição óssea (TAY *et al.*, 2005). Corroborando com estes achados a razão da expressão gênica RANK-L/OPG encontrou-se elevada nos animais nos quais foi induzida a doença periodontal (DPE), tratados somente com HPMC (veículo), contudo o GSNO foi capaz de reduzir a razão da expressão gênica de RANK-L/OPG.

Menezes *et al.* (2006) evidenciou imunomarcagem positiva para RANK-L e OPG em neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, e linfócitos presentes em CRs. Com base nos padrões de expressão de RANK-L/OPG em diferentes condições fisiológicas e patológicas sugere, que sítios com reabsorção óssea ativa apresenta um padrão diferencial da expressão RANK-L/OPG quando comparados com sítios onde a reabsorção óssea é ausente ou mínima. Em condições inflamatórias há um desequilíbrio nos níveis RANK-L/OPG levando a excessiva atividade osteoclástica e consequente reabsorção óssea patológica (MENEZES *et al.*, 2008).

O GSNO não inibe a translocação do complexo p65/p50 de NF- κ B para o núcleo, mas altera a estrutura do complexo p65/p50, bloqueando, assim, sua capacidade de se ligar ao DNA. Esta modificação de p65/p50 é provavelmente responsável pela ausência da expressão do gene de NOSi dependente de NF- κ B. Além disso, a inibição de mediadores inflamatórios em cultura de células através da inibição de NF- κ B, indica que o GSNO exerce um efeito antiinflamatório direto (KHAN *et al.*, 2005).

Os achados deste estudo sugerem que o GSNO inibe a produção de óxido nítrico via iNOS reduzindo assim a produção de óxido nítrico, com concomitante diminuição do estresse oxidativo. A redução da produção de NO diminui a síntese de citocinas pró-inflamatórias, e consequentemente, reduz expressão de RANK-L e RANK e aumenta a expressão gênica de OPG atenuando a reabsorção óssea na doença periodontal experimental.

Figura 21 - Modelo hipotético da redução da osteoclastogênese pelo GSNO na linhagem do osteoclasto na DPE



Fonte: Adaptado de Aeschlimann e Evans (2004).

7 CONCLUSÃO

- O GSNO em gel com matriz mucoaderente, portanto pode representar um agente promissor tratamento da doença periodontal, uma vez que reduziu a perda óssea alveolar na DPE.
- O GSNO administrado localmente é capaz de diminuir o estresse oxidativo, a produção de mediadores inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α .
- O GSNO é capaz de reduzir a expressão gênica de TNF- α , RANK e RANK-L/OPG.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo **CNPQ em atendimento ao Edital Universal – CNPq n°. 14/2011.**

REFERÊNCIAS

- ACHUTH, H. N.; MOOCHHALA, S. M.; MAHENDRAM, R.; LEE TAN, W. T. Nitrosoglutathione triggers collagen deposition in cutaneous wound repair. **Wound Repair Regen.**, v. 13, p. 383-389, 2005.
- AGUIRRE, J.; BUTTERY, L.; O'SHAUGHNESSY, M.; AFZAL, F.; FERNANDEZ, D. M.; HUKKANEN, M.; HUANG, P.; MACINTYRE, I.; POLAK, J. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. **Am. J. Pathol.**, v.158, p. 247-257, 2001.
- AKAOGI, J.; NOZAKI, T.; SATOH, M.; YAMADA, H. Role of PGE2 and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy. **Endocrine, Metabolic and Immune Disorders Drug Targets**, v. 6, p. 383-394, 2006.
- ALAYAN, J.; IVANOVSKI, S.; GEMMELL, E.; FORD, P.; HAMLET, S.; FARAH, C. S. Deficiency of iNOS contributes to Porphyromonas gingivalis-induced tissue damage. **Oral Micro-biol Immunol.**, v. 21, n. 6, p. 360-365, 2006.
- AL-SA'DONI, H.; FERRO, A. S-nitrosothiols: A class of nitric oxide-donor drugs. **Clin. Sci.**, v. 98, p. 507-520, 2000.
- AMADEU, T. P.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G.; COSTA, A. M. A. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 21, p. 629-637, 2007.
- ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; DUZZO, G.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquido de alta eficiência após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Ciência Farma.**, v. 44, p. 279-278, 2008.
- ARAÚJO-JUNIOR, R. F.; SOUZA, T. O.; MOURA, L. M.; TORRES, K. P.; SOUZA, L. B.; ALVES, M. S. C. F.; ROCHA, H. O.; DE ARAÚJO, A. A. Atorvastatin Decreases Bone Loss, Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Periodontitis. **Plos one**, v. 8, n.10, 2013.
- ARMOUR, K. E.; ARMOUR, K. J.; GALLAGHER, M. E. ; GODECKE, A. ; HELFRICH, M. H.; REID, D. M.; RALSTON, S. H. Defective bone formation and anabolic responses to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 142, p. 760-766, 2001.
- AZOUBEL, M. C. F.; MENEZES, A. M. A.; BEZERRA, D.; ORIÁ, R. B.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. Etoricoxib in experimental periodontitis. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 117-125, 2007.
- AZOUBEL, M. C. F.; SARMENTO, V. A.; CANGUSSU, V.; AZOUBEL, E.; BITTENCOURT, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Adjunctive benefits

of systemic etoricoxib in non-surgical treatment of aggressive periodontitis: short-term evaluation. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 1719-1725, 2008.

BASCONES-MARTÍNEZ, A.; MUÑOZ-CORCUERA, M.; NORONHA, S.; MOTA, P.; BASCONES-ILUNDAIN, C.; CAMPO-TRAPERO, J. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. **Med. Oral Patol. Oral Bucal**, v. 14, n. 12, p. e680-e685, 2009.

BATISTA, A. C.; SILVA, T. A.; CHUN, J. H.; LARA, V. S.; Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis.**, v. 8, n. 5, p. 254–260, 2002

BAUMGARTNER, S.; KRIST, J.; VRECER, F.; VODOPIVEC, P.; ZORKO, B. Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 195, n. 1-2, p. 125-135, 2000.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p.172–182, 2004.

BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. R. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in rats experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1009-1014, 2000.

BORGES JR, I.; MOREIRA, E. A. M.; WILHEM FILHO, D.; OLIVEIRA, T. B.; SILVA, M. B. S.; FRÖDE, T. S. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. **Mediators Inflamm.**, v. 2007, p. 1-5, 2007.

BOCH, J. A.; WARA-ASWAPATI, N.; AURON, P. E. Interleukin 1 signal transduction – current concepts and relevance to periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 2, p. 400-407, 2001

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-342, 2003.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003. **Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003**. Brasília, DF, 2004.

BUTLER, A. R.; RHODES, P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal. Biochem.**, v. 249, n. 1, p. 1–9, 1997.

BUTTERY, L. D.; AGUIRRE, I. J.; HUKKANEN, M. V.; MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; HUANG, P. L.; MACINTYRE, I.; POLAK, J. M. Nitric oxide stimulates osteoblast replication and development. **J. Bone Mineral Res.**, v. 14, p. 1154, 1999.

CARRANZA, F. A.; BERNARD, G. W. As Estruturas de Suporte do Dente. In: NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 2, p. 31-50.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROSS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

CROTTI, T.; SMITH, M. D.; HIRSCH, R.; SOUKOULIS, S.; WEEDON, H.; CAPONE, M.; AHM, M. J.; HAYNES, D. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, n. 38, p. 380–387, 2003.

DALCICO, R.; ADRIANA, M. A.; DEOCLECIANO, O. B.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Protective mechanisms of simvastatina in experimental periodontal disease. **Journal Periodontol.**, v. 84, n.8, p. 1145-1157, 2013.

DAMOULIS, P. D.; HAUSCHKA, P. V. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 201, p. 924-931, 1994.

DIAS, A. C. R.; SILVA, L. G.; COLOMBARI, E. O óxido nítrico (NO) no controle neural da pressão arterial: modulação da transmissão glutamatérgica no NTS. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 39, n. 1, p. 51-64, 2006.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 343-350, 2003

EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontol.**, v. 23, p. 19-49, 2000.

EL-LEITHY, E. S.; SHAKER, D. S.; GHORAB, M. H.; ABDEL-RASHID, R. S. Evaluation of Mucoadhesive Hydrogels Loaded with Diclofenac Sodium–Chitosan Microspheres for Rectal Administration. **AAPS PharmSciTech.**, v. 11, n. 4, 2010.

FAN, X.; ROY, E.; ZHU, L.; MURPHY, T. C.; ACKERT-BICKNELL, C.; HART, C. M.; ROSEN, C.; NANES, M. S.; RUBIN, J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. **Endocrinology**, v. 145, p. 751-759, 2004.

FELLER, R. L.; WILT, M. Evaluation of cellulose ethers for conservation. **The Getty Conservation Institute**, 1990.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 2, p. 32-39, 2007.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FUKADA, S. Y.; SILVA, T. A.; SACONATO, I. F.; GARLET, G. P.; ÁVILA-CAMPOS, M. J.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. **J. Dent. Res.**, v. 87, p. 1155-1159, 2008.

GAIO, E.J.; HAAS, A. N.; CARRARD, V.C.; OPPERMANN, R. V.; ALBANDAR, J.; SUSIN, C. Oral health status in elders from South Brazil: a population-based study. **Gerodontology**, v. 29, n. 3, p. 214-23, 2012.

GEORGII, J. L.; AMADEU, T. P.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, M. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogels improves healing of rat ischaemic wounds. **J tissue Eng Regen Med.**, v. 5, p. 612-619, 2011.

GOLDEN, B. D.; ABRAMSON, S. B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 25, p. 359-378, 1999.

GOLUB, L. M.; RYAN, M. E.; WILLIAMS, R. C. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. **Dent. Today**, v. 17, n. 10, p. 102-109, 1998.

GORSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALINSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p. 1046-1052, 2003.

GRANT, M.M.; BROCK, G.R.; MATHEWS, J. B.; CHAPPLE, I.L.C. Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 1, p. 17-23, 2010.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 3, p. 391-401, 2003.

HAYNES, D. Receptor activator NFκB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 4, p. 380-387, 2003.

HERRERA, B. S.; MARTINS-PORTO, R.; MAIA-DANTAS, A.; CAMPI, P.; SPOLIDORIO, C. L.; COSTA, S. K. P.; DYKE, T. E. V.; MUSCARA, M. N. iNOS-Derived Nitric Oxide Stimulates Osteoclast Activity and Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Rats. **J Periodontol.**, v. 11, n. 82, p. 1608-1615, 2011.

HOGG, N. Biological chemistry and clinical potential of nitrosothiols. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 10, p. 1478-1486, 2000.

HOLMSTRUP, P. Anatomia macroscópica do periodonto. In: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001. cap. 3, p. 17-26.

HONDA, T.; DOMON, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, p. 35-40, 2006.

IANARO, A.; I ODONNGLL, C. A.; DI ROSA, M. I.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokine and enhance interleukin-10 production in carrageenin-induced edema em mice. **Immunology**, v. 82, n.3, p. 370-375, 1994.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, p. 9265–9269, 1987.

JOHN, G.; BROT, N.; RUAN, J.; EUDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMP, S. T. P.; WEI SSBACH, H.; NATHAN, C. Peptide methionine sulfoxide reductase from *encherichia coli* and *mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage reactive nitrogen intermediates. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 9901-9906, 2001.

JOURD'HEUIL, D.; JOURD'HEUIL, F.; FEELISCH, M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 18, p. 15720-15726, 2003.

KAWAY, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONÇALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; YI-PING LI; MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W. O.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. **Am J Pathol.**, v.169, n.3, p. 987–998, 2006.

KEARY, C. M. Characterization of methocel cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. **Carbohydr. Polym.**, n. 45, p. 239-303, 2001.

KHAN, M.; SEKHON, B.; GIRI, S.; JATANA, M.; GILG, A. G.; AYASOLLA, K.; ELANGO, C.; SINGH, A. K.; SINGH, I. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 25, p. 177-192, 2005.

KELES, G. C.; ACIKGOZ, G.; AYAS, B.; SAKALLIOGLU, E.; FIRATLI, E. Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, p. 176-184, 2005.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v. 7, p. 2-10, 2001.

KESAVALU, L.; SHATHISHKUMAR, S.; BAKTHAVATCHALU, V.; MATTHEWS, C; DAWSON, D.; STEFFEN, M.; EBERSOLE, J. L. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 4, p. 1712, 2007.

KINNEY, J. S.; RAMSEIER, C. A.; GIANNOBILE, W. V. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1098, p. 230-251, 2007.

KJELDSEN, M.; HOLMSTRUP, P.; LINDEMANN, R. A.; BENDTZEN, K. Bacterial-stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 139-144, 1995.

KLOEK, J.; VAN ARK, I.; BLOKSMA, N.; DE CLERCK, F.; NIJKAMP, F. P.; FOLKERTS, G. Glutathione and other low-molecular-weight hiols relax guinea pig trachea ex vivo; interactions with nitric oxide. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 283, p. 1403-1408, 2002.

KOBAYASHI, M.; OKADA, N.; OKAMATSU, Y.; MUGIKURA, K.; NISHIHARA, T.; HANAZAW, S.; KITANO, S.; HASEGAWA, K. Intracellular interleukin-1 β production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 4, p. 840-849, 1999.

KOIDE, M.; KINUGAWA, S.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. **Periodontology**, v. 54, p. 235–246, 2010.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, p. 427-437, 2004.

KORNMAN, K. S. A patogenia das doenças periodontais: uma observação a mais. In: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos da periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001. cap. 1, p. 3-7.

LANGFORD, E. J.; BROWN, A. S.; WAINWRIGHT, R. J.; DE BELDER, A. J.; THOMAS, M. R.; SMITH, R. E.; RADOMSKI, M. W.; MARTIN, J. F.; MONCADA, S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. **Lancet**, v. 344, p. 1458–1460, 1994.

LAPPIN, D. F.; KJELDSEN, M.; SANDER, L.; KINANE, D. F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 35, p. 369–373, 2000.

LEE, S.; CHOI, H.; YANG, Y.; JEONG, G.; HWANG, J.; LEE, S.; KANG, K.; CHO, J.; CHAE, J.; LEE, S.; KIM, Y.; KIM, E. Nitric oxide modulates osteoblastic differentiation with heme-oxygenase-1 via the mitogen activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways in human periodontal ligament cells. **Biol. Pharm.**, v. 32, n. 8, p. 1328-1334, 2009.

LEITÃO, R. F. C.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R. F. C.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A. C.; LIMA, V.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 947-954, 2005.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 000, p. 1-7, 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p. 162-168, 2004.

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAUJO, M. Anatomia dos tecidos periodontais. In: LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 1, p. 3-47.

LIN, S. K.; KOK, S. H.; KUO, M. Y.; LEE, M.; WANG, C.; LAN, W.; HSIAO, M.; GOLDRING, S. R.; HONG, C. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. **J Bone Miner Res.**, v.18, n.1, p.39-46, 2003.

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T.; MELO, J. P. L. C.; FERREIRA, R. C. Q.; SILVEIRA, E. J. D.; DANTAS, E. M. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.**, v. 7, n. 2, p. 29-36, 2007.

LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X.; GAO, Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissue from generalized aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 11, p. 1545-1553, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analyses 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.

LOHINAI, Z.; BENEDEK, P.; FEHER, E.; GYORFI, A.; ROSIVALL, L.; FAZEKAS, A.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br J Pharmacol.**, v.123, n.3, p.353-360, 1998

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; SZÉKELY, A. D.; FEHÉR, E.; DÉZSI, L.; SZARBÓ, C. Evidence for the expression. Of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life Sci.**, v. 70, p. 279-290, 2010.

LÓPEZ-PÍRIZ, R.; AGUILAR, L.; GIMÉNEZ, M. J. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 12, p. 154-159, 2007.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A. S. M. T.; DATTA, H. K.; MOONGA, B. S.; LIDBURY, P. S.; HECKER, M.; VANE, J. R. Osteoclast inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 2936-2940, 1991.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBIMGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; BECHERINI, L.; MARTINETI, V.; MACINTYRE, I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 274, p. 477-481, 2000.

MARCACCINI, A. M.; MSCHIARI, C. A.; ZUARDI, L. R.; DE SOUSA, T. S.; TABA, M.; TEOFILO, J. M.; JACOB-FERREIRA, A. L. B.; TANUS-SANTOS, J. E.; NOVAES, A. B.; GERLACH, R. F. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2 and MPO decrease after periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, p. 180-190, 2010.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.

MATTHEWS, J. B.; WRIGHT, H. J.; ROBERTS, A.; COOPER, P. R.; CHAPPLE, I. L. C. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, p. 255-264, 2006.

MATHEWS, W. R.; KERR, S. W. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 1529-1537, 1993.

MENEZES, A. M. A. **Estudo do papel do S-nitrosoglutathione na Doença Periodontal Experimental e Na inflamação aguda.** Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, 2010.

MENEZES, A. M. A.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; CARVALHO, C. B. M.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 1901-1909, 2005.

MENEZES, R.; BRAMANTE, M. C.; PAIVA, K. B.S.; CARNEIRO, E.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J.M. Receptor activador NF κ B ligand and osteoprotegerin protein expression in human radicular cysts and granulomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, p.404-9, 2006.

MENEZES, A. M. A.; SOUZA G .F. P.; GOMES A. S.; LEITÃO R. F. C.; OLIVEIRA M. G. O. **S- Nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats**, v. 83, p. 514-21, 2012.

MENEZES, R.; GARLET, T.P.; BRAMANTE, C.M.; CAMPANELLI, A.P., FIQUEIRA, R.C.; SOGAVAR, M.C.; GRANJEIRO, J.M.; GARLET,G.P. Differential patterns of receptor activador of kappa B periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **Joe**, v. 34, n.8 p. 932-8, 2008.

MEYLE, J. Neutrophil chemotaxis and serum concentration of tumor-necrosis-factor α (TNF- α). **J. Periodont. Res.**, v. 28, p. 491-493, 1993.

MIHARA, M.; UCHIVAM, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v, 86, p. 271-278, 1978.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, p. 305-321, 2007.

MIRANDA, F. S. **Potencial terapêutico de s-nitrosoglutathione (GSNO) na insuficiência hepática aguda experimental induzida por paracetamol.** 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, 2012.

MIYASAKI, K. T.; NEMIROVSKIY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 27-32, 1997.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J. R. Soc. Med.**, v.

92, p. 164–169, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 193-201, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-141, 1991.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin. Chim. Acta.**, v. 15, n. 61, p. 63-71, 1975.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 4, n. 3, 2012.

NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C. L.; PENMAN, B. W.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, p. 3030-3034, 1992.

OATES, T. W.; GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. L. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.137-143, 2002.

ÖVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYLMAZ, E.; ERSOY, F.; ERATALAY, K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 35, p. 235-240, 1993.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 10, p. 255-264, 2005.

PANNU, R.; SINGH, I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. **Neurochem. Int.**, v. 49, p. 170-182, 2006.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol.**, v. 24, p. 239-252, 2000.

PEKEL, N.; YOSHII, F.; KUME, T.; GÜVEN, O. Radiation crosslinking of biodegradable hydroxypropylmethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p.139-147, 2004.

PERCIVAL, M. D.; OUELLET, M.; CAMPAGNOLO, C.; CLAVEAU, D.; LI, C. Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. **Biochemistry**, v. 38, p. 13574-13583, 1999.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 12, p. 2187-2193, 2005.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, p. 1809-1820, 2005.

PREISS, D. S.; MEYLE, J. Interleukin-1 α concentration of gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 423-428, 1994.

RADOMSKI, M. W.; REES, D. D.; DUTRA, A.; MONCADA, S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 745-749, 1992.

RALSTON, S. H.; TODD, D.; HELFRICH, M. H.; BENJAMIN, N.; GRABOWSKI, P. S. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 135, p. 330-336, 1994.

RIANCHO, J. A.; SALAS, E.; ZARRABEITIA, M. T.; OLMOS, J. M.; AMADO, J. A.; FERNANDEZ-LUNA, J. L.; GONZALEZ-MACIAS, J. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, p. 439-446, 1995.

RODRIGUES, A. M.; NEWMAN, M. G. Microbiologia e imunologia periodontal. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 2, p. 21-50.

ROSSOMANDO, E. F.; WHITE, L. A novel method for the detection of TNF-alpha in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, n. 64, p. 445-449, 1993.

SANDROS, J.; KARLSSON, C.; LAPPIN, D. F.; MADIANOS, P. N.; KINANE, D. F.; PAPAPANOU, P. N. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 10, p. 1808-1814, 2000.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

SATO, E. F.; CHOUDHURY, T.; NISHIKAWA, T.; INOUE, M. Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 42, p. 8-13, 2008.

SAVIDGE, T. C.; NEWMAN, P.; POTHOUKAKIS, C.; RUHL, A.; NEUNLIST, M.; BOURREILLE, A.; HURST, R.; SOFRONIEW, M. V. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, p. 1344-1358, 2007.

SEABRA, A. B.; ROCHA, L. L.; EBERLIN, M. N.; OLIVEIRA, M. G. Solid films of blended poly (vinyl alcohol) / poly (vinyl pyrrolidone) for topical S-nitrosoglutathione and nitric oxide release. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 994-1003, 2005.

SHADDOX L.M.; WIEDEY.N.L.; CALDERON, I.; MAGNUSSON, I.; BIMSTEIN, E.; BIDWELL, J. A.; ZARPET, E. F.; AUKHIL, I.; WALLET, S. M.; Local inflammatory Markers and Systemic Endotoxin in Aggressive Periodontitis. **J Dent Res.**, v. 90, p.1140-144, 2011.

- SHISHIDO, S. M.; SEABRA, A. B.; LOH, W.; OLIVEIRA, M. G. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potencial uses for local and controlled nitric oxide release. **Biomaterials**, v. 24, p. 3543-3553, 2003.
- SIMOES, M. M. G. **Revestimento de stents com filme de poli(alcool vinílico) eluidos de s-nitrosuglutathiona**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- SINGH, R. J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 31, p. 18596-18603, 1996.
- SINGH, S. P.; WISHNOK, J. S.; KESHIVE, M.; DEEN, W. M.; TANNENBAUM, S. R. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, p. 14428-14433, 1996.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; ROÇAS, I. N. Microbiology and treatment acute apical abscessos. **Clin. Microbil. Rev.**, v. 26, n. 2, p. 255-273, 2013.
- SKEFF, M. A.; BRITO, G. A.; OLIVEIRA, M. G.; BRAGA, C. M.; CAVALCANTE, M. M.; BALDIM, V.; AFONSO, R. C. H.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COLOMBO, A. P.; RIBEIRO, R. A.; MOURA- NETO, V.; LEITÃO, R. F. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil induced oral mucositis. **Plos One**, 2014.
- TAY, J.Y.; BAY, B.H.; YEO, J. F.; HARRIS, M.; MEGHJI, S.; DHEEN, S.T. Identification of RANK-L in osteolytic lesions of the facial skeleton. **J Dent Res.**, v. 83, p. 349-53, 2004.
- TAMAKI, N.; ORIHUELA-CAMPOS, R. C.; INAGAKI, Y.; FUKUI, M.; NAGATA, T.; ITO, H.O. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/ AMPK and the Nrf2/ antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. **Fre Radical Bio. Med.**, v.75, p. 222-229, 2014
- TANAKA, Y.; NAKAYAMADA, S.; OKADA, Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, p.325–328, 2005.
- TAT, S. K.; PELLETIER, J. P.; VELASCO, C. R.; PADRINES, M.; MARTEL-PELLETIER, J. New perspectiva in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potencial therapeutic target? **Keio J. Med.**, v. 58, n. 1, p. 29-40, 2009.
- VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1692– 1712, 2005.
- VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the patogénesis of periodontal diseases. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 2, p.82-90, 2003.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 78-87, 1998.

- VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p. 1797-1804, 1997.
- VENKETARAMAN, V.; DAYARAM, Y. K.; AMIN, A. G.; NGO, R.; GREEN, R. M.; TALAUE, M. T.; MANN, J.; CONNELL, N. D. Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1864-1871, 2003.
- VUEBA, M. L.; DE CARVALHO, L. A. E. B; VEIGA, F.; SOUSA, J. J.; PINA, M. E.; Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 51-59, 2004.
- WEI, S.; KITaura, H.; ZHOU, P.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. IL-1 mediates TNF induced osteoclastogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p.282-290, 2005.
- YAMALIK, N.; ÇAGLAYAN, F.; KILINÇ, K.; KILINÇ, A.; TÜMER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 460-467, 2000.
- ZAMAN, K.; HANIGAN, M. H.; SMITH, A.; VAUGHAN, J.; MACDONALD, T.; JONES, D. R.; HUNT, J. F.; GASTON, B. Endogenous S-nitrosoglutathione modifies 5-lipoxygenase expression in airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 34, p. 387-393, 2006.
- ZHANG, F.; ENGBRETSON, S. P.; MORTON, R. S.; CAVANAUGH JR., P. F.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, p. 861-867, 2003.

APÊNDICE A - Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Balança digital eletrônica para a pesagem dos animais- Filisola;
- Balança Analítica- Marte
- Centrifuga refrigerada- Solab
- Micro centrifuga- Novatécnica
- Espectrofotômetro- Bioespectro
- Geladeira e freezer (-70%)- Continental
- Leitora de Elisa- Epoch
- Máquina fotográfica digital- Cammon
- Homoginizador de tecidos
- Medidor de PH-P
- Mili-Q
- Microscópico Leica acoplado ao computador
- Micrótomo Leica
- Placas de Elisa
- Termociclador Bio Rad
- Seringas (B-D)
- Pipetas Gilson automáticas de 1000, 200, 20, 10, 5,1 μ L
- Ponteiras para pipetas automáticas
- Tubo Falcon (15 e 50ml)
- Vortex
- Vidrarias: béqueres, pipetas manuais, tubos de ensaios, provetas

Fármacos, Anticorpos, Líquidos ; Soluções e Corantes Utilizados:

- Alcool etílico (Dinâmica)
- Xilol (Dinâmica)
- Acetona (Sigma)
- Anticorpo primário de coelho anti-NOSi (Santa Cruz Biothechnology)
- Anticorpo primário de coelho RANK, (Santa Cruz Biothechnology)
- Anticorpo primário de cabra TRAP (Santa Cruz Biothechnology)

- Anticorpo primário de cabra anti OPG ostoprotegerina (Santa Cruz Biothechnology)
- Anticorpo primário de cabra RANK L (Santa Cruz Biothechnology)
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biothechnology)
- Trisol (LifeTecnologies)
- HPMC Hidropropilmetilcelulose (Sigma)
- DTNB 0,01 M (Fluka)
- Eosina (Merck)
- Kit para dosagem de fosfatase alcalina (Labtest)
- Glutathione (Sigma)
- Formol 10% (Reagen)
- Éter etílico P.A (Dinâmica)
- Kit Pricossirus ...
- Kit DuoSet (R&D Systems) para dosagem de citocinas IL-1 e TNF- α
- Nitrito de Sódio (Sigma Aldrich)
- Nitrato Redutase (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma)
- Solução Salina
- Xilazina e Quetamina
- Hematoxilina (Dinâmica)
- Heparina (Cristália)
- Solução de o-dianidissina
- Solução PBS

Tampão fosfato de potássio----- 16,7 mg.

H₂O₂----- 10 ml.

Água destilada----- 50 mL.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilam

HTAB (Sigma)----- 5 g.

Tampão fosfato de potássio----- 1 L.

- Tampão fosfato de potássio (Dinâmica)
- EDTA ácido triclo..

Tris----- 4, 84 g.

EDTA 0,2 M----- 10ml

Água destilada----- 100ml

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



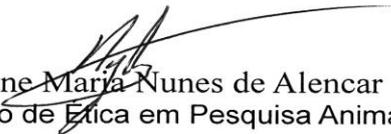
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 10/2013, sobre o projeto intitulado: **“EFEITO DA APLICAÇÃO LOCAL DO GEL DE NITROSOTIOL GSNO NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 25 de setembro de 2013


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2166369