



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

MARIANA DOS REIS LIMA

**EFEITO DA *CALENDULA OFFICINALIS* EM RATOS SUBMETIDOS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL: PARTICIPAÇÃO DAS VIAS RANK-
RANKL-OPG E WNT/ β -CATENINA**

FORTALEZA

2016

MARIANA DOS REIS LIMA

**EFEITO DA *CALENDULA OFFICINALIS* EM RATOS SUBMETIDOS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL : PARTICIPAÇÃO DAS VIAS RANK-
RANKL-OPG E WNT/ β -CATENINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Goes

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- L699e Lima, Mariana dos Reis.
Efeito da CALENDULA OFFICINALIS em ratos submetidos à periodontite experimental :
participação das vias RANK-RANKL-OPG e WNT/ β -CATENINA / Mariana dos Reis
Lima. – 2016.
65 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão.
Coorientação: Profa. Dra. Paula Goes .
1. Periodontite. 2. Calendula officinalis. 3. Receptores WNT. I. Título.

CDD 611

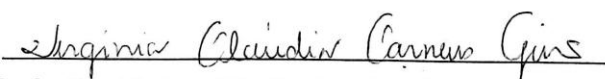
MARIANA DOS REIS LIMA

EFEITO DA *CALENDULA OFFICINALIS* EM RATOS SUBMETIDOS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL: PARTICIPAÇÃO DAS VIAS RANK-
RANKL-OPG E WNT/ β -CATENINA

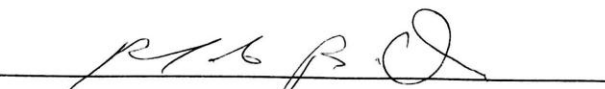
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal
do Ceará, como requisito para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de
concentração: morfofisiologia óssea e articular.

Aprovada em: 07 / 12 / 16.

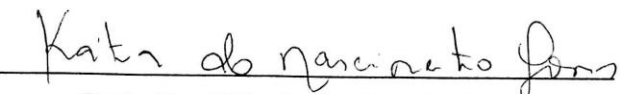
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Kátia do Nascimento Gomes
Centro Universitário Católica de Quixadá (UNICATÓLICA)

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Dra Paula Goes desde a ideia do trabalho à finalização do mesmo. Por ter me incentivado a ler artigos, pela paciência, amizade e, pela firme orientação. Aprendi muito com você durante esse período. Serei eternamente grata!

À Dra Virgínia Girão, por ter aceitado ser a minha orientadora sem ao menos me conhecer. Pela ajuda nos procedimentos laboratoriais e, pelas valiosas contribuições desse trabalho.

Ao nosso grupo de estudos NepDio, em especial, à IC Amanda Pimentel Lopes que esteve sempre comigo ajudando nos experimentos, sacrificando os finais de semana, sempre sorridente e amável.

À Conceição da Silva (Josiane) e Deiziane Viana por toda ajuda durante os meus experimentos. Foram muito importantes durante todo o processo de trabalho.

Às técnicas de laboratório do NEMPI Maria do Socorro França Monte e Flávia de Araújo Silva pela confecção das lâminas histológicas.

À Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES pois, obtivemos ótimos resultados utilizando suas facilidades e, aos técnicos José Valdemir Silveira e Rosemayre Souza Freire pela aquisição das imagens de imunofluorescência no confocal e microscopia eletrônica de varredura.

À FUNCAP pelo apoio financeiro necessário para o desenvolvimento desse estudo.

Muito obrigada!

RESUMO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória que causa perda de tecido conjuntivo e osso alveolar. A *Calendula officinalis* (CLO) tem sido utilizada pelos seus efeitos anti-inflamatórios. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar efeito da CLO na perda óssea alveolar (POA) em ratos com foco na participação do eixo RANK-RANKL-OPG e da via WNT/ β -catenina. A periodontite experimental (PE) foi induzida através da inserção do fio (nailon 3.0) em torno do 2º molar superior esquerdo, e hemiarcada contralateral usada como controle. Os animais foram divididos em grupos: Normal, não submetido a nenhum procedimento; Salina (SAL), que receberam 2 ml/kg de solução salina 0,9% - v.o.; ou CLO na dose de 90 mg/kg - v.o. 30 min antes da PE e diariamente durante por 11 dias até eutanásia. Para avaliação do tecido periodontal realizaram-se análises macroscópica, por microtomografia computadorizada, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia confocal e microscopia por luz polarizada, imunohistoquímica para WNT 10b, β -catenina, DKK-1, RANK, RANKL e OPG. Por ocasião da eutanásia foi removido tecido gengival para avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA). O tratamento com CLO preveniu de forma significativa a POA, preservou a microestrutura interna ($p < 0,05$) e topografia do tecido ósseo, e preservou também as fibras colágenas do ligamento periodontal, quando comparado a SAL. A CLO provocou aumento significativo de células imunopositivas para WNT 10b, β -catenina e OPG e redução na imunomarcagem de DKK-1, RANK ($p > 0,05$) e RANKL. CLO reduziu os níveis de MDA gengivais comparados a SAL ($p < 0,05$). Desta forma, podemos concluir que a CLO previne a POA com participação do eixo RANK-RANKL-OPG e da via WNT/ β -catenina.

Palavras-chave: Periodontite. *Calendula officinalis*. Receptores WNT

ABSTRACT

Periodontitis is an infecto-inflammatory disease that leads to connective tissue and alveolar bone loss. *Calendula officinalis* (CLO) has been used due to its anti-inflammatory effects. Therefore the aim of this study was to evaluate the effect of CLO on alveolar bone loss (ABL) in rats focusing on RANK-RANKL-OPG and WNT signaling pathways. Experimental periodontitis (EP) was induced through placement of a nylon ligature around the upper left 2nd molar, and the hemimaxilla used as control. The animals were divided in groups: Normal, subjected to no treatment; Saline (SAL), that received 2 ml/kg of 0,9% saline solution orally; or CLO at 90 mg/kg orally, 30 minutes before EP and daily for 11 days until euthanasia. In order to evaluate the periodontal tissue, it macroscopic, micro-tomographic, electron scanning microscopy (SEM), confocal microscopy and polarized light microscopy analyses were performed, as well as immunohistochemistry for WNT 10b, β -catenin, DKK-1, RANK, RANKL, and OPG. During euthanasia the gingival tissue was removed for malonaldehyde (MDA) assay. Treatment with CLO significantly prevented ABL, preserved bone internal microstructure ($p < 0.05$) and topography, and also preserved collagen fibers from the periodontal ligament, when compared to SAL. CLO significantly increased the number of immunopositive cells for WNT 10b, β -catenin and OPG and reduced DKK-1, RANK ($p > 0.05$) and RANKL. CLO reduced the gingival levels of MDA compared to SAL ($p < 0.05$). In this way, we can conclude that CLO prevented ABL via RANK-RANKL-OPG and WNT signaling pathway.

Keywords: Periodontitis. *Calendula officinalis*. WNT Receptors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1- A relação entre infiltrado inflamatório e perda óssea periodontal.....	16
Figura 2- Eixo RANK-RANKL-OPG.....	18
Figura 3- Via de sinalização WNT/ β -catenina.....	20
Figura 4- Efeito da CLO na perda óssea alveolar.....	33
Figura 5- Efeito da CLO na microarquitetura do tecido ósseo alveolar.....	34
Figura 6- Efeito da CLO na topografia do tecido ósseo alveolar.....	36
Figura 7- Efeito da CLO na distribuição de minerais do tecido ósseo alveolar.....	37
Figura 8- Efeito da CLO nas fibras colágenas do ligamento periodontal.....	39
Figura 9- Efeito da CLO nas fibras colágenas do do ligamento periodontal coradas com Picrosirius Red analisadas sob filtro de luz polarizada.....	40
Figura 10- Efeito da CLO na quantificação de células marcadas imunopositivamente.....	42
Figura 11- Efeito da CLO na imunexpressão de marcadores da via WNT.....	43
Figura 12- Efeito da CLO na imunexpressão de marcadores do eixo RANK-RANKL-OPG.....	44

Figura 13- Efeito da CLO sobre os níveis gengivais de malondialdeído (MDA).....	45
---------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

°C	Graus centígrados
μCT	Micro-tomografia computadorizada
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CLO	<i>Calendula officinalis</i>
DKK	Dickkopf
dl	Decilitro
EDS	Espectrometria de energia dispersiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
EPM	Erro padrão da média
GSK3β	Glicogênio sintase quinase 3
kg	Quilograma
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar

MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia eletrônica por varredura
mg	Miligrama
mm ²	Milímetro quadrado
ml	Mililitro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nmol	Nanomolar
nm	Nanômetro
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução salina tamponada
RANK	Receptor ativador do Fator Nuclear-κB
RANKL	Ligante do Receptor ativador do Fator Nuclear-κB
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
SOST	Esclerostina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	Fator de necrose tumoral
Wnt	Proteína wingless

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
®	Marca registrada
+	Mais
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
&	E

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO..... 15
1.1	A doença periodontal..... 15
1.2	Eixo RANK-RANKL-OPG e via WNT como reguladores do metabolismo ósseo..... 16
1.3	<i>Calendula officinalis</i> (CLO)..... 20
2	JUSTIFICATIVA..... 23
3	OBJETIVOS..... 24
3.1	Objetivo Geral..... 24
3.2	Objetivos Específicos..... 24
4	MÉTODOS..... 25
4.1	Desenho do estudo e Aspectos éticos..... 25
4.2	Seleção dos animais..... 25
4.3	Modelo de Periodontite Experimental..... 25
4.4	Grupos Experimentais..... 26
4.4.1	Grupo Normal..... 26
4.4.2	Grupo Salina..... 26
4.4.3	Grupo <i>Calendula officinalis</i> (CLO)..... 26
4.5	Análise macroscópica do tecido ósseo..... 26
4.5.1	Macroscopia..... 26
4.5.2	Micro-Tomografia Computadorizada (μ CT)..... 27

4.6	Análise microscópica.....	27
4.6.1	Microscopia eletrônica por varredura (MEV).....	27
4.6.2	Microscopia Confocal.....	28
4.6.3	Coloração de picrosirius red sob filtro de luz polarizada.....	29
4.6.4	Imunohistoquímica para DKK1, WNT 10b, β -catenina, RANK, RANKL e OPG.....	29
4.6.5	Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	30
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Efeito da CLO na perda óssea alveolar.....	32
5.2	Efeito da CLO na microarquitetura do tecido ósseo alveolar.....	32
5.3	Efeito da CLO na topografia e distribuição dos minerais do tecido ósseo alveolar.....	35
5.4	Efeito da CLO nas fibras colágenas do ligamento periodontal.....	38
5.5	Efeito da CLO na imunoexpressão de WNT10b, DKK1, β -catenina, RANKL, RANK e OPG.....	41
5.6	Efeito da CLO nos níveis gengivais de Malondialdeído (MDA).....	45
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal...	64
	ANEXO B - Extrato Aquoso da Calêndula.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é um complexo tecidual que liga o elemento dentário ao tecido ósseo, seja da maxila ou da mandíbula, e forma a unidade estrutural e funcional constituída por: gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Estes três últimos componentes constituem o periodonto de inserção, enquanto a gengiva compõe o periodonto de proteção (PETERSEN; OGAWA, 2005). O periodonto pode ser acometido pela doença periodontal que é uma condição infecto-inflamatória, de alta prevalência, afetando cerca de 90% da população mundial (KAYAL, 2013; PETERSEN; OGAWA, 2005) e no Brasil a prevalência é de 79% (ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007), sendo considerada a segunda principal causa de perda dentária (KAYAL, 2013).

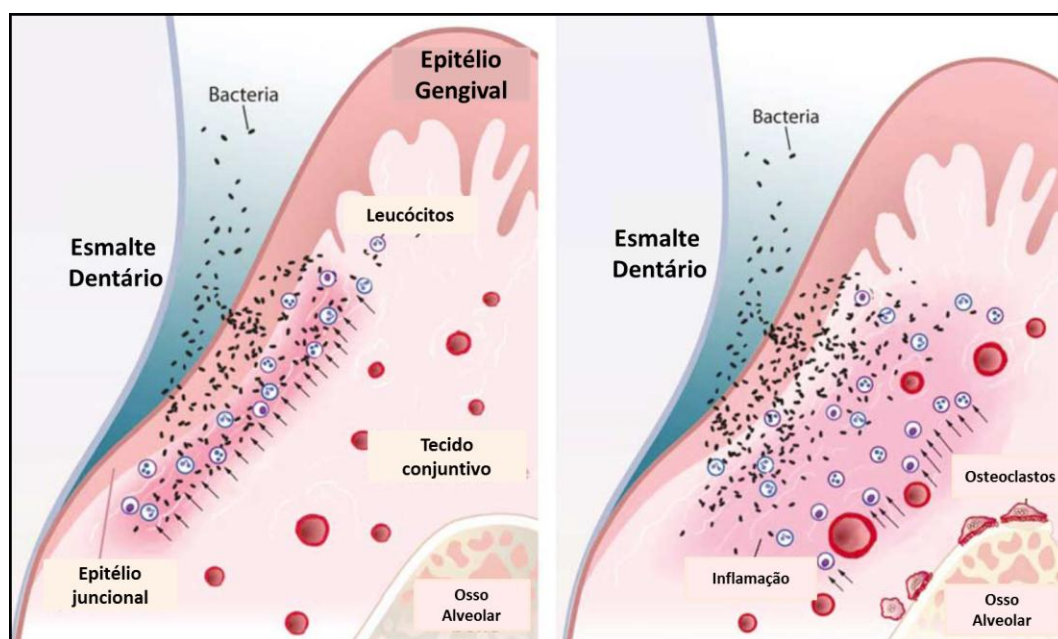
A etiologia da doença periodontal é tida como multifatorial, onde o biofilme dental estimula a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, resultando em destruição tecidual (PIHLSTROM et al., 2005; REDLICH et al., 2012). Em resposta ao desafio microbiano, leucócitos polimorfonucleares, invadem o tecido periodontal e induzem a liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Figura 1) (D'AIUTO, F. et al, 2010). As EROs reagem com membrana plasmática das células causando peroxidação lipídica e conseqüentes alterações na estrutura e função das membranas celulares. A peroxidação lipídica avalia o estresse oxidativo por meio do ensaio de malondialdeído (MDA), o produto final da degradação causada por estresse oxidativo (GUENTSCH et al., 2008).

A exacerbação do processo inflamatório no periodonto culmina com a destruição de fibras colágenas especialmente do ligamento periodontal associado à reabsorção de osso (ZHENG et al., 2015). Clinicamente essa destruição tecidual pode ser avaliada por meio de sondagem que revela a presença de bolsa periodontal e perda de inserção periodontal, aliada a exames de imagem que confirmam a perda óssea (CARRANZA et al., 2011).

O tratamento clássico da doença periodontal consiste em controle mecânico do biofilme supra e subgengival e raspagem e alisamento radicular

(SOUKOS; GOODSON, 2011). No entanto, considerando o papel do hospedeiro na etiologia da periodontite, tratamentos convencionais podem, em alguns casos, apresentar insucesso e, portanto, o uso de adjuvantes à terapia clássica, que atuem modulando a resposta do hospedeiro pode ser uma boa estratégia para um tratamento bem sucedido (ARWEILER et al., 2013).

Figura 1. A relação entre infiltrado inflamatório e perda óssea periodontal.



(Fonte: GRAVES et al., 2011) Na periodontite, bactérias se aderem à superfície do dente às margens gengivais. Uma resposta inflamatória é induzida no tecido conjuntivo (setas pretas). Se o infiltrado inflamatório está a uma distância do osso (painel da esquerda), a osteoclastogênese não é ativada. No entanto, se o infiltrado estiver próximo ao tecido ósseo (painel da direita), os osteoclastos são induzidos e ocorre reabsorção óssea.

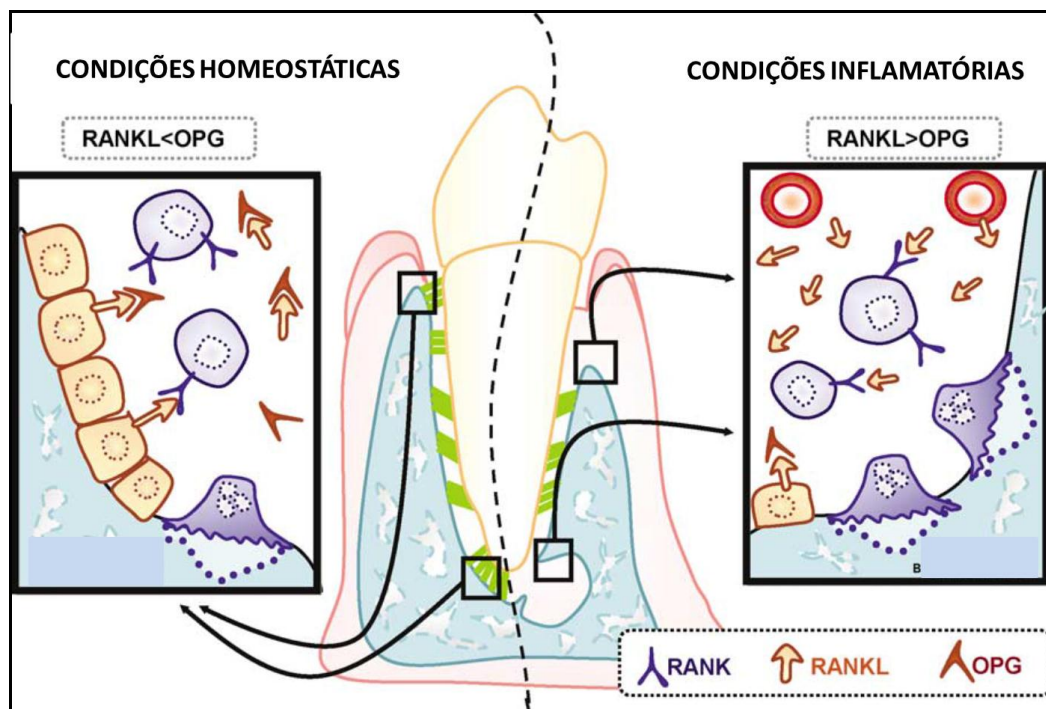
1.2. EIXO RANK-RANKL-OPG E VIA WNT COMO REGULADORES DO METABOLISMO ÓSSEO

Considerando que o osso é um dos principais tecidos afetados pela doença periodontal é interessante conhecer um pouco sobre o papel de

alguns reguladores do metabolismo ósseo na manutenção da homeostasia e em condições patológicas.

O eixo receptor ativador do fator nuclear NF- κ B (RANK) - ligante de RANK (RANKL) –osteoprotegerina (OPG) tem se destacado como um importante modulador da homeostasia óssea (HIENZ et al., 2015; OKAMOTO et al., 2011). A interação entre RANKL, que expresso na membrana do osteoblasto (COCHRAN, 2008), ao RANK, expresso no osteoclasto, promove aumento na diferenciação e atividade de osteoclasto levando à reabsorção óssea (BAR-SHAVIT, 2007). Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG), secretada por osteoblastos, age bloqueando a interação RANKL:RANK, inibindo portanto a osteoclastogênese (HARDY et al., 2009). Porém em certas condições inflamatórias crônicas, tais como na periodontite, observa-se um desequilíbrio neste eixo do RANK-RANKL-OPG, uma vez que mediadores pró-inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) -6, -1, dentre outras, estimulam outros tipos celulares, especialmente os linfócitos T e células estromais, a expressão de RANKL em suas membranas, favorecendo assim a ativação de osteoclastos (Figura 2) (ZUPAN et al., 2013).

Figura 2. Eixo RANK-RANKL-OPG.



(Fonte: GRAVES et al., 2011). O equilíbrio RANKL/OPG é um fator importante na regulação da reabsorção óssea em ambientes periodontais e periapicais. A diferenciação e ativação de osteoclastos são acionados pela interação de RANK (ativador do receptor do fator nuclear κ B) com o seu ligante, RANKL. A OPG é um receptor de RANKL que inibe o envolvimento RANKL-RANK. Em condições homeostáticas (lado esquerdo), os níveis de RANKL e OPG estão em equilíbrio. Com um estímulo inflamatório, o RANKL / OPG aumenta e leva à estimulação da atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea patológica, ao nível periodontal e periapical.

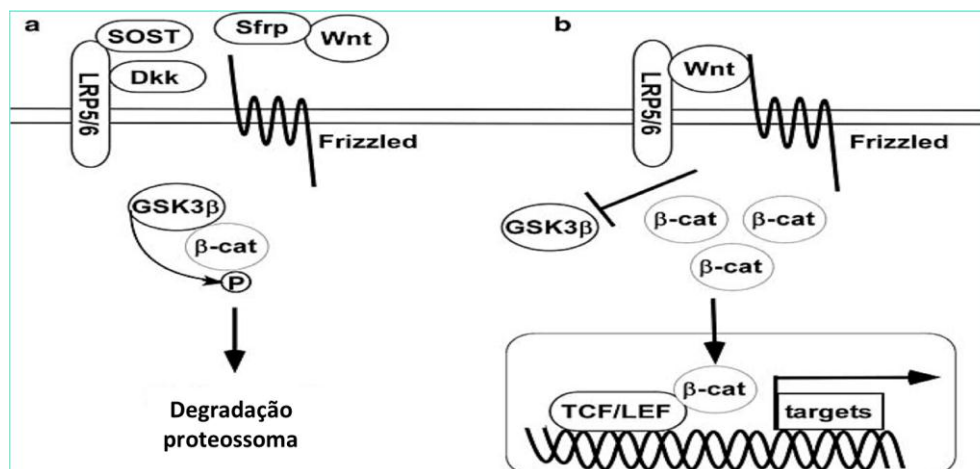
Mais recentemente, uma outra via de sinalização tem ganhado destaque como mais um regulador da homeostasia óssea, a via canônica WNT/ β -catenina (KOBAYASHI et al., 2016; RING et al., 2014). No tecido ósseo, quando as proteínas wntless (WNTs) se ligam ao seu receptor LRP5/6 e Frizzled, induzem inibição da enzima citoplasmática glicogênio sintase quinase 3 ($GSK3\beta$), o que favorece a estabilização da β -catenina, que por sua vez, se acumula no citoplasma e acessa o núcleo onde ativa fatores de transcrição, RUNx2, Osterix, por exemplo, os quais promovem diferenciação de

osteoblastos que futuramente irão provocar aumento da produção de OPG (BARON & KNEISSEL, 2013).

As Wnts são de uma família de 19 proteínas segregadas que medeiam importantes processos biológicos como embriogênese e organogênese. A Wnt 10b é importante para a diferenciação dos osteoblastos, manutenção da massa óssea (BODINE & KOMM, 2006; RAUNER et al., 2008), e traduz os seus sinais através da via canônica que é dependente da β -catenina (RAUNER et al., 2008).

A regulação desta via é feita pela ação de Dickkopf (DKK) e Esclerostina (SOST), que impedem a interação WNTs:receptor, favorecendo a ubiquitinação e degradação da β -catenina via proteossoma (BARON & KNEISSEL, 2013) (Figura 3). A expressão de inibidores da via canônica parece ser induzida por ação de mediadores inflamatórios (RAUNER et al., 2013). Neste contexto, sabendo que a inflamação tem papel importante na patogênese de desordens ósseas torna-se interessante estudar o efeito de agentes farmacológicos que atuem modulando o processo inflamatório, mas que apresentem baixa frequência de efeitos adversos, com destaque para a *Calendula officinalis* (CLO).

Figura 3. Via de sinalização WNT/ β -catenina.



(Fonte: KUBOTA et al., 2009). Quando as Wnts se ligam ao seu receptor, ocorre inibição de GSK3 β , favorecendo a estabilização da β -catenina que por sua vez se acumula no núcleo e ativa fatores de transcrição que promovem diferenciação de osteoblastos e aumento da produção de OPG (Figura B). A regulação desta via é feita pela ação de DKKs e Esclerostina, que impedem a interação WNTs:receptor, favorecendo a fosforilação e degradação proteossômica da β -catenina. Os inibidores da via canônica são induzidos pela ação de mediadores inflamatórios.

1.3. *Calendula officinalis* (CLO)

A CLO é uma erva anual de origem do Mediterrâneo, popularmente usada na cicatrização e como agente anti-inflamatório (PARENTE et al., 2012). Mais de 100 fitoquímicos com ação farmacológica já foram identificados a partir do extrato bruto dessa planta, dentre eles: quercetina, carotenoides, luteína, licopeno, rutina, ubiquinona, xantofilas, e outros anti-oxidantes, (SAINI et al., 2012). A quercetina é um flavonóide presente na flor da CLO que tem ação anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e psicoestimulante, bem como a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária e permeabilidade capilar (LI et al., 2016). A quercetina exerceu ação anti-inflamatória e atividade imunomoduladora em vários modelos de murinos (MORIKAWA et al., 2003). A biodisponibilidade relativamente baixa da

quercetina pode ser atribuída à sua baixa absorção, metabolismo e/ou eliminação rápida (LI et al., 2016). Embora raro, sensibilização à calêndula e reações alérgicas de contato, incidentes de choque anafilático após gargarejo com uma infusão de *Calendula* têm sido relatadas (ARORA et al., 2013).

Tem sido reportado que o extrato de *Calendula officinalis* inibe a infiltração de leucócitos em modelos de inflamação com carragenina e prostaglandina E em ratos (SHIPOCHLIEV et al., 1981), estimula a proliferação e migração de fibroblastos 3T3 de camundongos em baixas concentrações de 10 µg/ml (FRONZA et al., 2009) e, apresenta ação anti-inflamatória e antibacteriana, bem como propriedades angiogênicas e de ativação fibroblástica, modulando a inflamação e atuando nas fases proliferativas do processo de cicatrização (PARENTE et al., 2012). Foi demonstrado que o extrato de Calêndula, nas doses de 250 e 500 mg/kg administrado por via oral, produziu inibição significativa do edema de pata em animais induzido por carragenina, bem como da inflamação produzida por dextrano (PREETHI et al., 2009). No modelo de inflamação crônica usando formalina, o extrato de Calêndula reduziu de forma significativa a inflamação quando comparado ao controle (PREETHI et al., 2009). Além disso, o nível aumentado de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, -6, TNF-alfa e interferon (IFN)- gama, e proteínas de fase aguda como a proteína C reativa, produzidas pela injeção de LPS foram inibidas pelo extrato de Calêndula, confirmando a excelente ação anti-inflamatória desta planta (PREETHI et al., 2009).

Nas doenças periodontais, foi descrito efeito positivo do gel de Calêndula associado ao Clobetasol (3% de CLO) no tratamento da gengivite descamativa (MACHADO et al., 2010). A Calêndula também foi avaliada na forma de colutório (1% de CLO) em pacientes com gengivite (LAUTEN et al. 2005). Apesar do estudo de Lauten et al. (2005) não ter observado diferença estatística entre os grupos, provavelmente devido ao reduzido número amostral, os efeitos adversos relatados foram mínimos. Em modelos animais de ratos submetidos à periodontite experimental, um estudo recente deste grupo mostrou que o extrato de CLO na dose de 90 mg/kg exerce importante

atividade antirreabsortiva óssea com inibição de mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-1 e a diminuição da enzima mieloperoxidase (MPO) (Dados não publicados, ALEXANDRE, JTM.).

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo que a periodontite é uma doença inflamatória, que o processo inflamatório pode favorecer a desregulação de vias de sinalização da homeostasia óssea, tais como o eixo RANK-RANKL-OPG e a via WNT/ β -catenina, e que a *Calendula officinalis* (CLO) é uma erva que apresenta importante efeito antiinflamatório, nos parece ser interessante estudar o efeito da CLO em ratos submetidos à periodontite experimental com ênfase a participação das vias de sinalização RANK-RANKL-OPG e WNT/ β -catenina.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Verificar o efeito da *Calendula officinalis* em ratos submetidos à periodontite experimental com ênfase na participação das vias de sinalização RANK-RANKL-OPG e WNT/ β -catenina

3.2. Específicos

- Avaliar a perda óssea alveolar (POA) através de: análise macroscópica, por μ -Tomografia Computadorizada (CT) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), em ratos submetidos à periodontite e tratados com CLO.
- Quantificar a expressão de DKK-1, WNT 10b, β -catenina, RANK, RANKL e OPG, por imunohistoquímica, em tecido ósseo de ratos submetidos à periodontite e tratados com CLO.
- Avaliar a presença e arranjo de fibras colágenas do ligamento periodontal entre os primeiro e segundo molares através da microscopia confocal em ratos submetidos à periodontite e tratados com CLO.
- Avaliar a presença e tipo de fibras colágenas do ligamento periodontal através da microscopia de luz polarizada em lâminas coradas por *Picrosirius red* em ratos submetidos à periodontite e tratados com CLO.
- Avaliar o estresse oxidativo por meio de dosagem dos níveis de MDA, no tecido gengival, em ratos submetidos à periodontite e tratados com CLO.

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo prospectivo, randomizado, controlado e cego, utilizando modelos animais de ratos submetidos à periodontite. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) guidelines para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010). Os experimentos foram iniciados logo após aprovação na Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFC, protocolo nº 38/15 (Anexo A), o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de Janeiro 1978) e pelos Guias Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas – CIOMS).

4.2. Seleção dos animais

Foram utilizados 54 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea de aproximadamente 180 - 200 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC. Todos receberam ração comercial balanceada e água *ad libitum*, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22°C durante todo o experimento. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais e apreciadas pelo comitê de pesquisa em animais da UFC.

4.3. Modelo de Periodontite Experimental

Para indução da periodontite foi utilizado o modelo induzido por ligadura baseado em de Lima et al. (2000), que consiste na inserção de um fio de sutura de náilon 3.0, em torno do 2º molar superior esquerdo de um rato sob anestesia com Ketamina e Xilazina (75 mg/kg de Ketamina + 8 mg/kg de Xilazina-i.m.). Logo em seguida a passagem do fio, foi dado um nó cirúrgico voltado para a face vestibular do animal. Os animais foram eutanasiados, por

meio de overdose de barbitúrico Tiopental (100mg/kg) + Lidocaína (7 mg/kg) – i.p. no 11º dia, dia de pico das lesões, com perda óssea intensa (DE LIMA et al., 2000).

4.4. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos experimentais.

4.4.1. Grupo Normal

Esse grupo foi constituído por 6 ratos acompanhados por um período de 11 dias, sendo então, eutanasiados. Nenhum procedimento foi realizado nesses animais.

4.4.2. Grupo Salina

Esse grupo foi constituído por 6 ratos submetidos à periodontite conforme descrito anteriormente. Os animais receberam solução salina a 0,9% (2ml/kg por gavagem), 30 minutos antes da instalação do fio e após este, diariamente por um período de 11 dias, sendo então, eutanasiados (GOES et al., 2012).

4.4.3 Grupo *Calendula officinalis* (CLO)

Esse grupo foi constituído por 6 ratos submetidos à periodontite, os quais receberam o extrato em veículo aquoso de *Calendula officinalis* (Laboratório Mapric – São Paulo, SP) (Anexo B), na dose de 90 mg/kg (PREETHI et al., 2009), administrado por via oral, 30 minutos antes da instalação do fio e após este, diariamente, até o 11º dia, sendo então, eutanasiados.

4.5. Análise macroscópica do tecido ósseo

4.5.1. Macroscopia

Os animais foram sacrificados no 11º 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 hemiarçadas foram montadas em massa de modelar e fotografadas (Nikon® modelo D40). As imagens digitais obtidas foram submetidas à análise pelo software Image J®. O software calcula a área correspondente que vai da ponta de cúspide a borda óssea remanescente dos lados com periodontite e normal. A área de perda óssea é obtida pela subtração dos valores do lado com periodontite e normal. Essa área foi calculada inicialmente em pixels, que foi posteriormente convertidos em mm². Essa conversão é possível devido ao uso de um padrão de milímetros fixado ao lado das maxilas (GOES et al., 2010, 2012, 2014, 2016).

4.5.2. Micro-Tomografia Computadorizada (μCT)

Os mesmo espécimes utilizados para análise macroscópica foram escaneados por micro-tomógrafo (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O raio-x foi operado em um potencial acelerado de 60 kV com um feixe de 165 μA e tempo de exposição de 560 ms por projeção. As imagens foram produzidas com um tamanho de voxel de 8x8x8 μm. Foi feita a análise volumétrica da região de furca utilizando o software do fabricante (CT-Analyser®, versão 1.13.5.1+, Bruker, Kontich, Bélgica). Nesta análise foi medido o percentual de preenchimento de osso na área de furca do segundo molar superior, a porosidade óssea, a média de espessura trabecular e a densidade mineral óssea da região de interesse (LISBOA et al., 2015).

4.6. Análise microscópica

4.6.1. Microscopia eletrônica por varredura (MEV)

Um grupo adicional de animais foi submetido à periodontite e após 11 dias foram eutanasiados e suas maxilas foram removidas, fixadas em Karnovsky por no mínimo 6 horas, depois mantidas em um tampão Cacodilato. As maxilas foram cortadas em uma cortadeira com disco diamantado (vestibular-palatina) para a obtenção do fragmento da maxila (fragmento de 0,5 X 0,2 cm e com 0,5 mm de espessura). Foi colocado o

fragmento em um eppendorf e deixado no dessecador por 24h para secagem. Os fragmentos foram montados em *stubs* para a realização da metalização com ouro em pó (Metalizador Quorum QT150ES, Quorum Technologies, Laughton, Inglaterra) para a análise por microscopia eletrônica por varredura (MEV inspect-50, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) (MACIEL-OLIVEIRA et al., 2011). Foi avaliado a topografia óssea da região interproximal entre o primeiro e segundo molares superiores (LU et al., 2014). Adicionalmente, foi utilizado o *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS) que é um detector (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido) instalado na câmara de vácuo do MEV e através do software do fabricante (AZtecEnergy, Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido) foram realizadas as análises elementar e química da amostra.

4.6.2. Microscopia Confocal

Um grupo adicional de animais foi utilizado para análise por microscopia confocal. Para tanto, após 11 dias os animais foram eutanasiados e suas hemiarcadas removidas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. A seguir, as peças foram submetidas a tratamento com EDTA 10%, por 30 dias, para a desmineralização, seguido de banho em água corrente por 24 horas. As peças foram armazenadas em álcool absoluto até sua inclusão em parafina. Após a inclusão das hemimaxilas em parafina, foram feitos os cortes seriados de 4 μ m em micrótomo apropriado e as lâminas coradas pelo método de Hematoxilina & Eosina (DE LIMA et al., 2000). Sabendo que o colágeno é uma proteína estrutural que apresenta um fenômeno natural de autofluorescência (MONICI, 2005), as lâminas obtidas foram analisadas utilizando o microscópio Confocal LSM 710 (Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) e o software do fabricante (Zen 2.1 lite black, 64-bit version , 758 MB, Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) para avaliar presença de fibras colágenas. Foi utilizado um laser de comprimento de onda de 488 nm e canal de emissão de fluorescência FITC-verde. Para as análises a região escolhida foi o ligamento periodontal entre o primeiro e segundo molares superiores (CARVALHO et al., 1999; GONÇALVES et al., 2014; ORIÁ et al., 2003).

4.6.3. Coloração de *Picrosirius Red* sob filtro de luz polarizada

A coloração de *Picrosirius Red* (PSR) é um método simples e sensível de identificar o tipo de colágeno fibrilar (JUNQUEIRA et al., 1979) aumentando sua birrefringência quando analisado sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al. 1979; MONTES & JUNQUEIRA 1991), sendo birrefringência amarelo-avermelhada relacionada a colágeno tipo I, enquanto o colágeno tipo III está associado a uma coloração esverdeada (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES & JUNQUEIRA 1991). Portanto para esta análise, secções histológicas obtidas a partir dos blocos de parafina previamente confeccionados foram coradas pelo método de *Picrosirius Red* e analisadas sob filtro de luz polarizada. Foi avaliado a presença e o tipo de fibras colágenas do ligamento periodontal entre o primeiro e segundo molares superiores (CINTRA et al., 2016; LÓPEZ DE LEON & ROJKIND, 1985).

4.6.4. Imunohistoquímica para DKK1, WNT 10b, β -catenina, RANK, RANKL e OPG

A imunohistoquímica para RANK, RANKL, OPG, WNT10b, β -catenina foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os tecidos ósseos foram desidratados em álcool 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), e (9.0) sob aquecimento em banho-maria, por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95°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 feito bloqueio de proteína com BSA 5% por 20 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário de cabra para RANK (Santa Cruz Biotechnology, Dallas,

TX, USA) diluído 1:200, RANKL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) diluído 1:100, β -catenina 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anticorpo anti-cabra OPG diluído 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anticorpo policlonal anti-coelho para WNT10 diluído 1:200 (ABCAM, Cambridge, MA, USA) em anticorpo diluente, anticorpo policlonal para DKK diluído 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) biotilado IgG de cabra e coelho diluído 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-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% (DALCICO et al., 2013; HSU & RAINE, 1981). As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM 1000, Wetzlar, Alemanha). Foi realizado a contagem de células imunomarcadas positivamente ao redor do tecido ósseo localizado na região interproximal entre os primeiro e segundo molares superiores em no mínimo 5 campos por lâmina (ANDRADE et al., 2008).

4.6.5. Dosagem de malondialdeído (MDA)

A concentração de malondialdeído (MDA) nos tecidos é utilizada como indicador da peroxidação lipídica (ANTUNES et al., 2008) e sua dosagem permite investigar o estresse oxidativo pelo método baseado na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico – TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA a fim de ser formado um cromóforo róseo. Inicialmente foi preparado um homogenato a 10% do tecido

gingival macerado em cloreto de potássio (KCl) a 1,15%. Deste homogenato, 62,5 µL foram adicionados em microtubo seguido de adição de 375 µL de ácido fosfórico (1%) e 125 µL de tiobarbitúrico (0,6%). Em seguida, as amostras foram imersas em banho maria por 45 minutos a 100°C. Decorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 500 µL de n-butanol e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 200 µL da fase superior foi inserida em placa e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535nm. Os níveis de MDA na gengiva foram determinados pelo método de Mihara e Uchivam (1978) e os resultados foram expressos em nmol/mg de gengiva.

4.7. Análise estatística

Para os dados paramétricos, os resultados foram expressos como Média±Erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism versão 6.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni.

Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

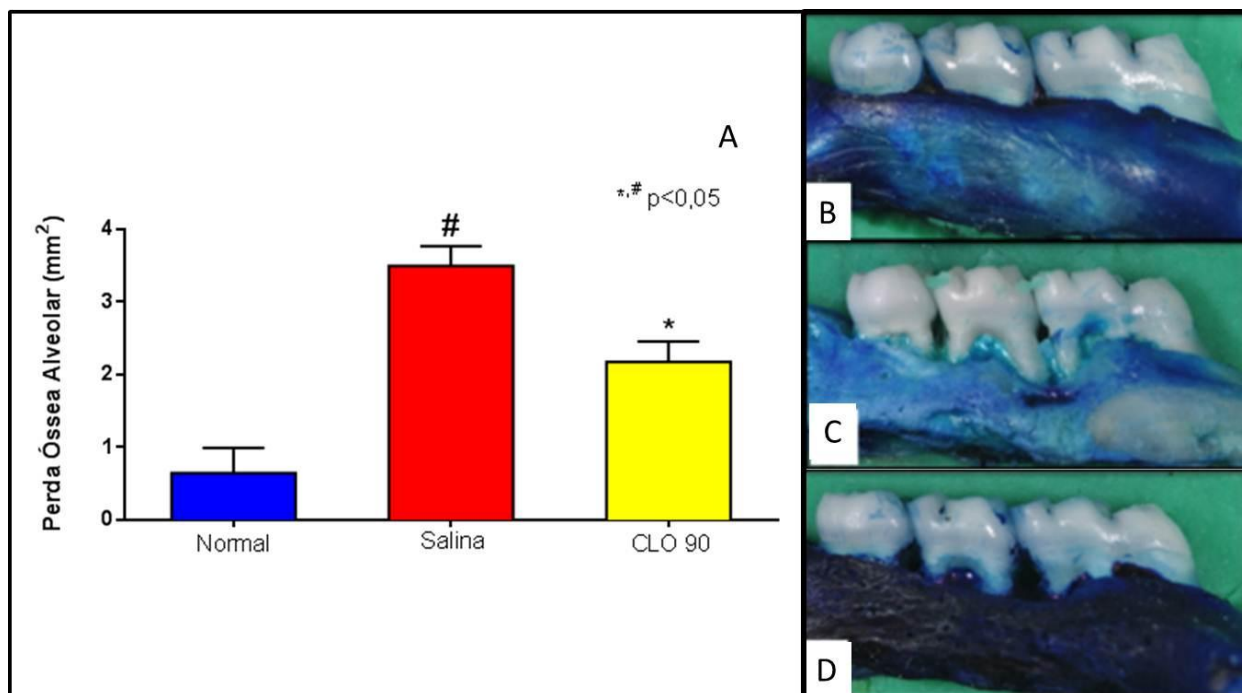
5.1. Efeito da CLO na Perda Óssea Alveolar

Figura 4A mostra o efeito da CLO na quantificação da perda óssea. O modelo de periodontite experimental causou intensa reabsorção óssea ($3,79 \pm 0,37 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo normal ($p < 0,05$) (Figura 4B). Tal reabsorção foi associada à exposição radicular e lesão de furca (Figura 4C). O tratamento com CLO foi capaz de prevenir a perda óssea ($2,17 \pm 0,27 \text{ mm}^2$) em 42,8% quando comparado ao grupo Salina ($p < 0,05$). Os animais tratados com CLO 90 mg/kg (Figura 4D) mostraram maior preservação do tecido ósseo.

5.2. Efeito da CLO na microarquitetura do tecido ósseo alveolar

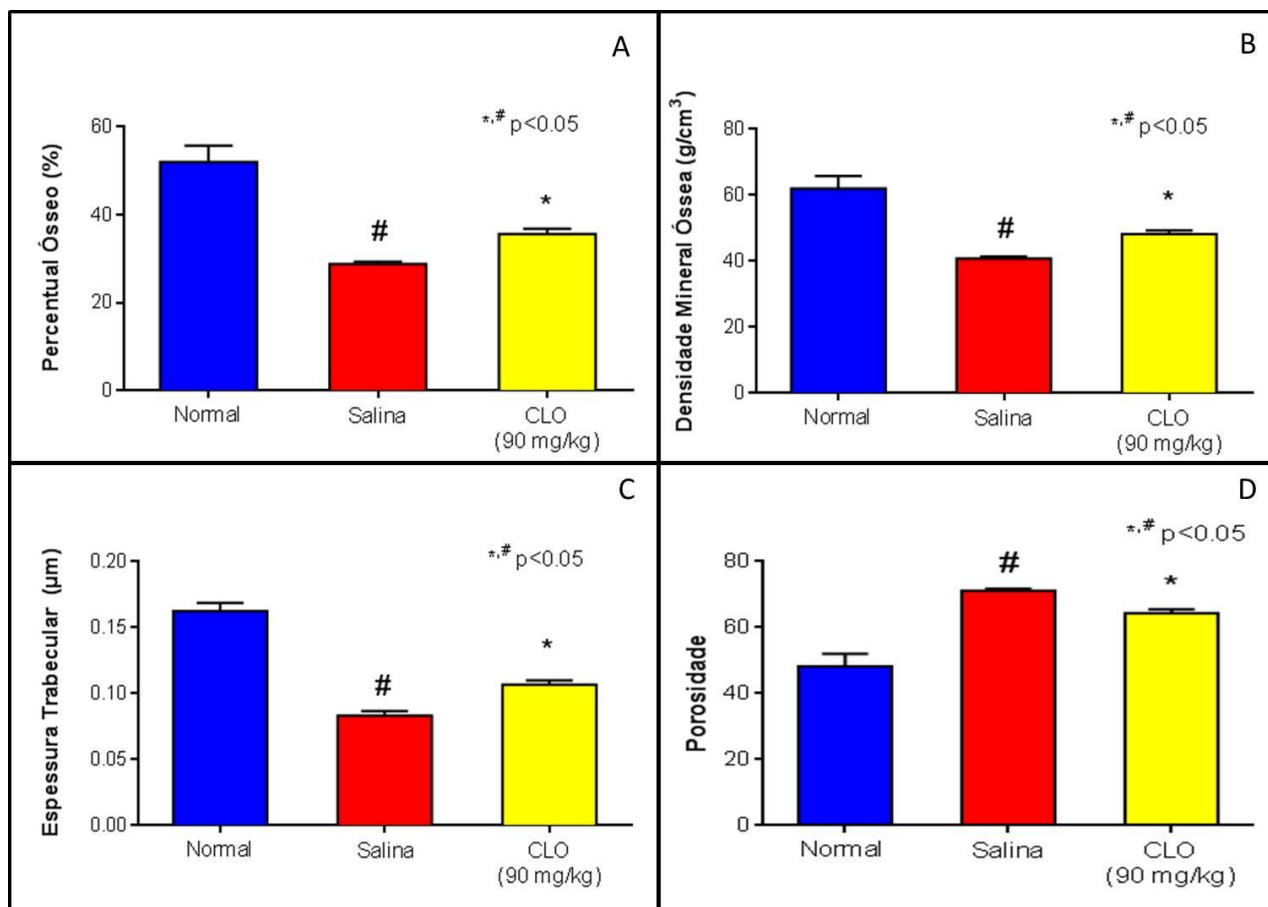
A Figura 5 mostra as medidas volumétricas do tecido ósseo analisadas por meio de μ -CT. Os animais do grupo Salina mostram redução significativa do percentual ósseo (Figura 5A), da densidade mineral óssea (Figura 5B), da espessura trabecular (Figura 5C), com aumento da porosidade do tecido ósseo (Figura 5D) quando comparado ao Normal. O tratamento com CLO, por sua vez, preveniu a redução do percentual ósseo, da densidade mineral óssea, da espessura trabecular, bem como do aumento da porosidade do tecido ósseo.

Figura 4. Efeito da CLO na perda óssea alveolar.



Quantificação de perda óssea (A). Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. Aspecto macroscópico da hemimaxila de um animal do grupo normal (B), hemimaxila de um rato submetido à periodontite que recebeu solução Salina (C), hemimaxila de um rato submetido à periodontite tratado com CLO 90 mg/kg (D). (#) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Normal. (*) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina. (ANOVA e Bonferroni) ($p < 0,05$).

Figura 5. Efeito da CLO na microarquitetura do tecido ósseo alveolar.



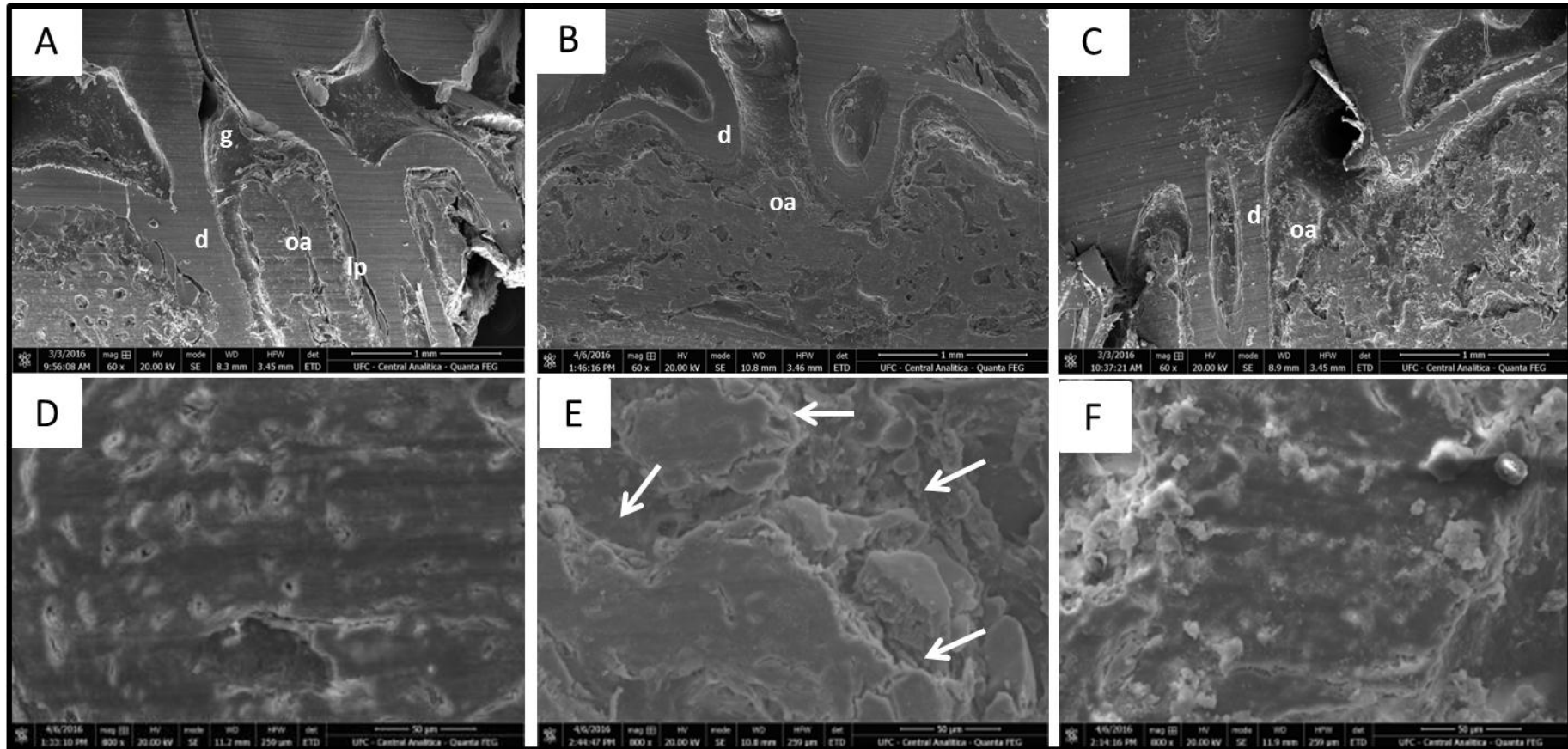
Percentual ósseo (A), densidade mineral óssea (B), espessura trabecular (C) e porosidade (D). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (#) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Normal. (*) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina. (ANOVA e Bonferroni) ($p<0,05$).

5.3. Efeito da CLO na topografia e distribuição de minerais do tecido ósseo alveolar

Para análise da perda óssea por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 6), um outro ensaio foi realizado, e em seguida as hemimaxilas foram processadas. Foi observado que a periodontite causou importante destruição do tecido ósseo (Figura 6B) quando comparado ao grupo Normal (Figura 6A). A CLO preveniu a perda óssea (Figura 6C). No aumento de 800x foi possível observar que o tecido ósseo do animal do grupo Salina (Figura 6E) se apresentou menos compacto e com topografia mais irregular quando comparado ao tecido ósseo do animal do grupo normal (Figura 6D). O tratamento com CLO (Figura 6F) preservou a estrutura óssea quando comparado ao grupo Salina.

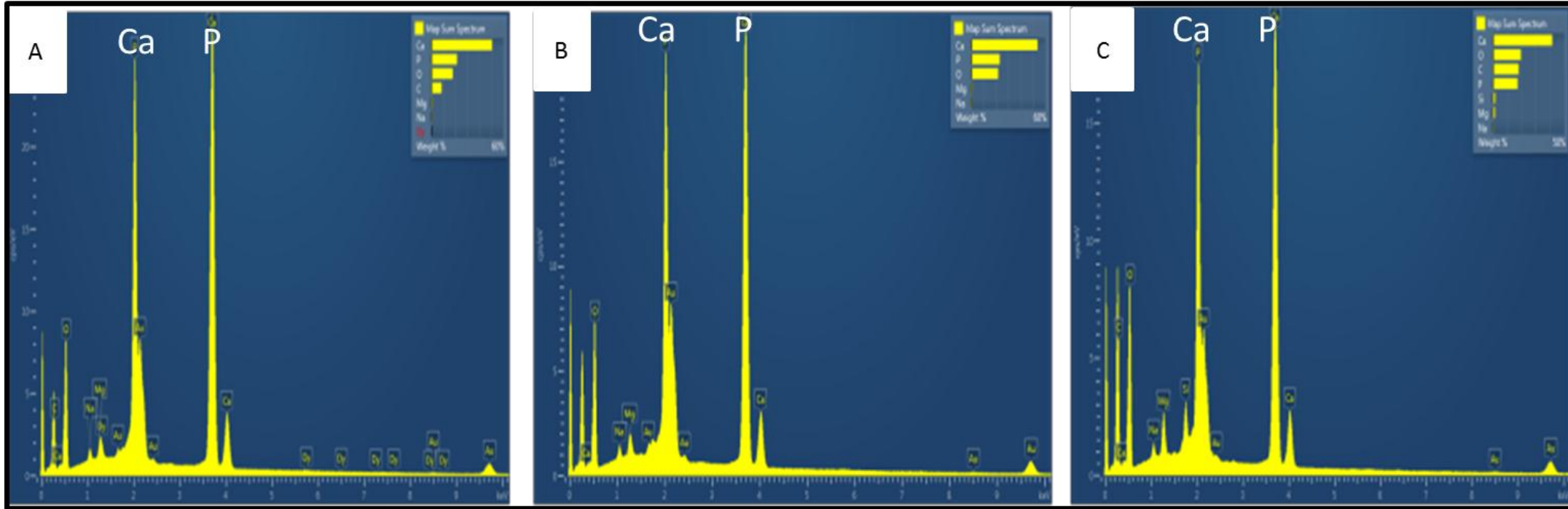
O detector de elétrons instalado na câmara de vácuo do microscópio eletrônico de varredura permitiu a imediata identificação dos minerais presentes e um mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando um mapa composicional de elementos desejados (Figura 7). Esta análise mostrou picos elevados de cálcio e fósforo no osso sem haver, no entanto, diferenças significativas entre os grupos.

Figura 6. Efeito da CLO na topografia do tecido ósseo alveolar.



Normal (A e D), Salina (B e E) e CLO (C e F). Dentina (d); Osso alveolar (oa); Ligamento periodontal (lp); Gengiva (g). (→) irregularidade do tecido ósseo. (Ampliação de 60x e 800x).

Figura 7. Efeito da CLO na distribuição de minerais do tecido ósseo alveolar.



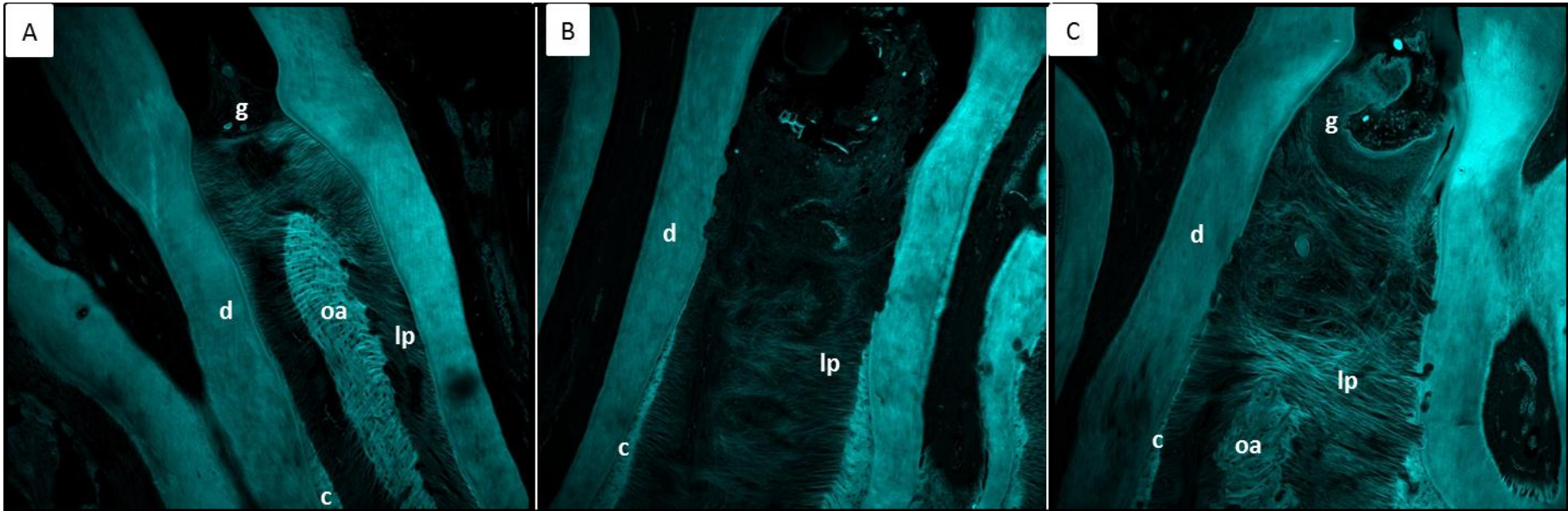
Normal (A), Salina (B) e CLO (C). Picos representam a presença de minerais no tecido ósseo.

5.4. Efeito da CLO nas fibras colágenas do ligamento periodontal

A análise confocal do tecido periodontal de animais submetidos à periodontite experimental (Figura 8B) demonstrou considerável destruição e desarranjo de fibras colágenas do ligamento periodontal comparado ao grupo Normal (Figura 8A). O tratamento com 90 mg/kg de CLO (Figura 8C) preservou as fibras colágenas do ligamento periodontal.

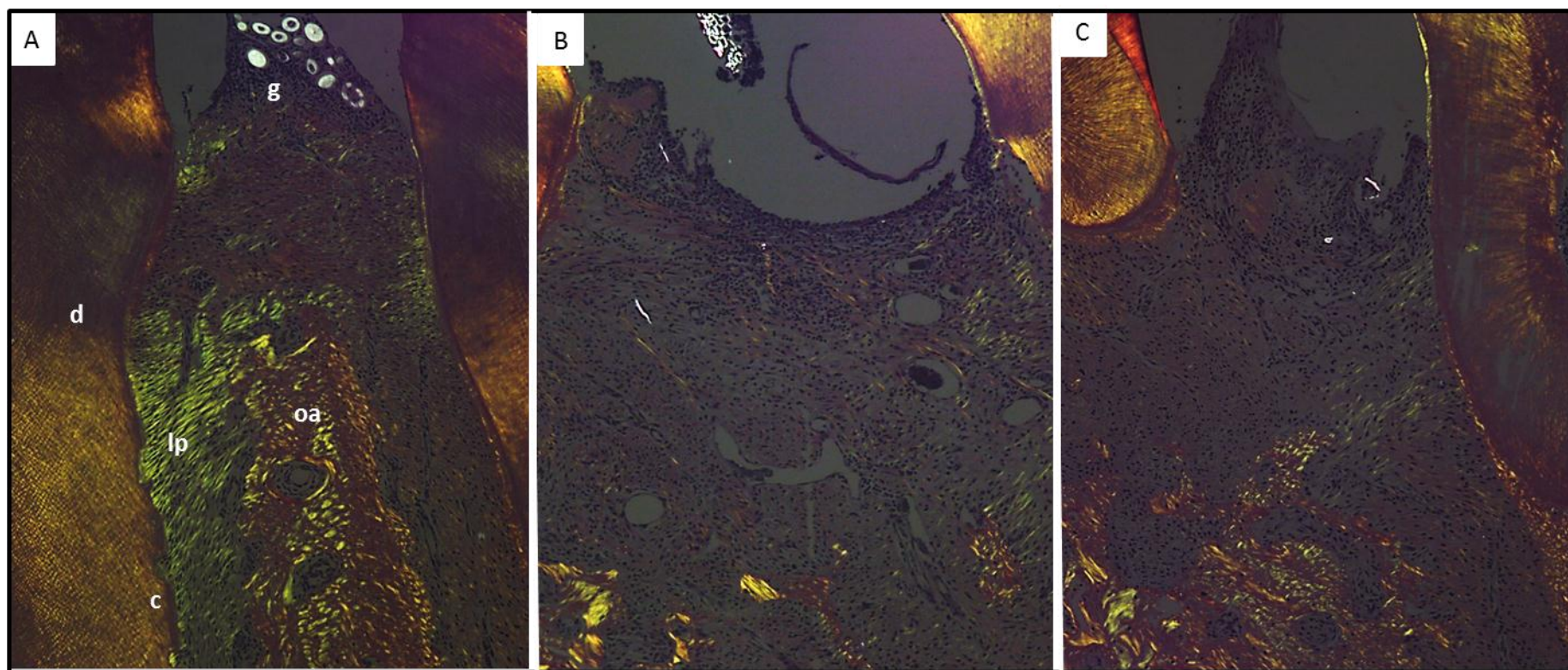
Usando a coloração de *Picrosirius red* e analisando as lâminas sob luz polarizada foi possível observar que a maioria das fibras colágenas do ligamento periodontal no tecido normal se apresentaram na coloração verde (Figura 9A). As fibras colágenas do ligamento periodontal dos animais do grupo Salina mostraram redução da birrefringência quando comparado aos do grupo Normal (Figura 9B). Tratamento com CLO causou leve aumento da birrefringência das fibras colágenas dos ligamento periodontal quando comparado a Salina, com fibras em coloração esverdeada (Figura 9C)

Figura 8. Efeito da CLO nas fibras colágenas do ligamento periodontal.



Normal (A), Salina (B) e CLO (C). Dentina (d); Osso alveolar (oa); Ligamento periodontal (lp); Gengiva (g); Cimento (c).
(Ampliação de 40x)

Figura 9. Efeito da CLO nas fibras colágenas do ligamento periodontal coradas com Picosírius Red e analisadas sob filtro de luz polarizada.



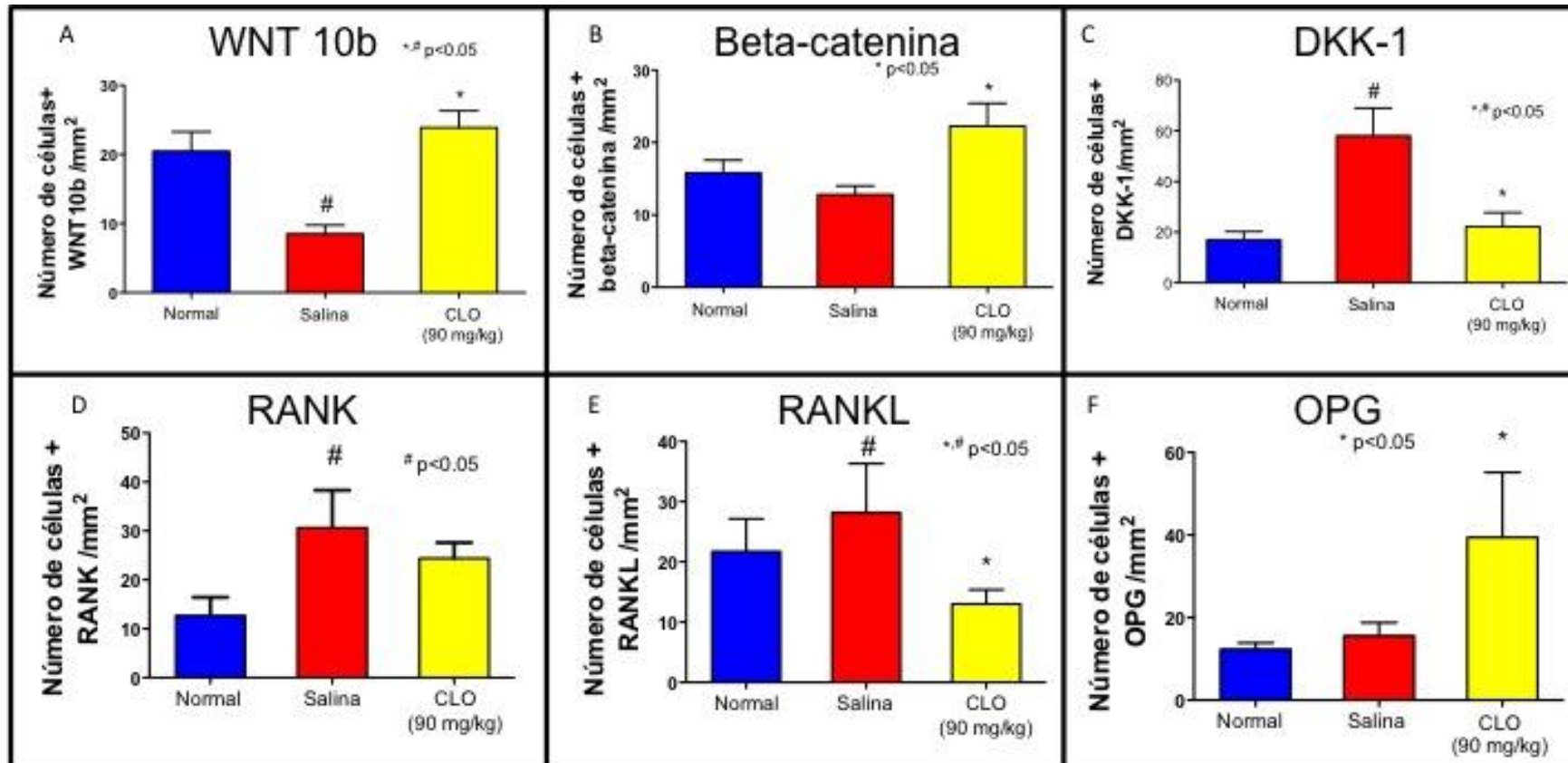
Efeito da CLO na disposição das fibras colágenas. Normal (A), Salina (B) e CLO (C). Dentina (d); Osso alveolar (oa); Ligamento periodontal (lp); Gengiva (g) (Ampliação de 40x)

5.5. Efeito da CLO na imunoposição de WNT10b, DKK-1, beta-catenina, RANKL, RANK e OPG

Em relação à via de sinalização WNT, os animais submetidos a periodontite experimental que receberam solução salina mostraram redução da quantidade de células imunopositivas para WNT 10b ($8,50 \pm 1,25$ células positivas/ mm^2) (Figura 10A, 11B) ($p < 0,05$), β -catenina ($12,80 \pm 1,20$) (Figura 10B, 11E) ($p > 0,05$), e aumento para DKK-1 ($58,00 \pm 11,03$) (Figura 10C, 11H) ($p < 0,05$) quando comparado ao Normal (WNT 10b= $22,44 \pm 2,82$ [Figura 11A]; β -catenina= $15,80 \pm 1,77$ [Figura 11D]; DKK-1= $17,00 \pm 3,21$ [Figura 11G]). Quanto ao eixo RANK-RANKL-OPG, os animais do grupo Salina mostraram aumento significativo de RANK ($30,67 \pm 4,41$) (Figura 10D, 12B) e RANKL ($28,17 \pm 3,32$) (Figura 10E, 12E), quando comparado ao Normal (RANK= $12,67 \pm 2,18$ (Figura 12A; RANKL= $13,00 \pm 0,89$ (Figura 12D). Não houve diferença na quantidade de células imunopositivas para OPG ($15,57 \pm 1,21$) (Figura 10F, 12H) quando comparado ao grupo normal ($12,33 \pm 0,88$) (Figura 12G).

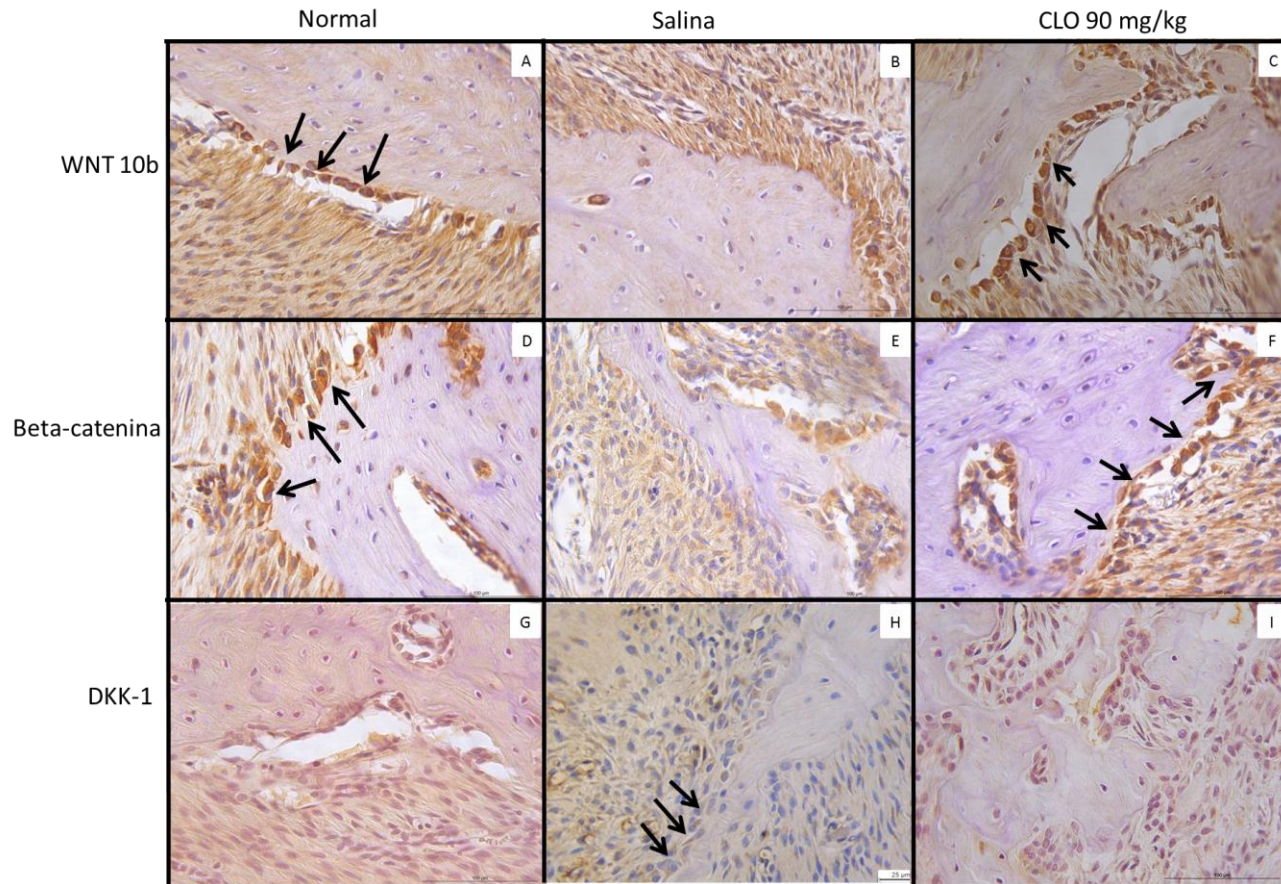
O tratamento com CLO 90 mg/kg promoveu aumento de células imunopositivas para WNT 10b ($23,89 \pm 2,41$) (Figura 10A, 11C) e β -catenina ($22,25 \pm 3,16$) (Figura 10B, 11F) de forma significativa quando comparado ao grupo Salina (valores de WNT= $8,50 \pm 1,25$; β -catenina= $12,80 \pm 1,20$). Houve redução significativa da imunomarcção para DKK nos animais do grupo CLO ($22,20 \pm 5,55$) (Figura 10C, 11I) quando comparado a Salina ($58,00 \pm 11,02$). O tratamento com CLO não preveniu o aumento da imunomarcção para RANK ($22,40 \pm 1,43$) (Figura 10D, 12C) quando comparado ao Salina (Figura 10D), mas causou redução significativa da imunomarcção de RANKL ($21,72 \pm 1,28$) (Figura 10E) (Figura 10E, 12F) associado a aumento de OPG ($39,43 \pm 5,94$) (Figura 10F) (Figura 10F, 12I) ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Salina.

Figura 10. Efeito da CLO na quantificação de células marcadas imunopositivamente.



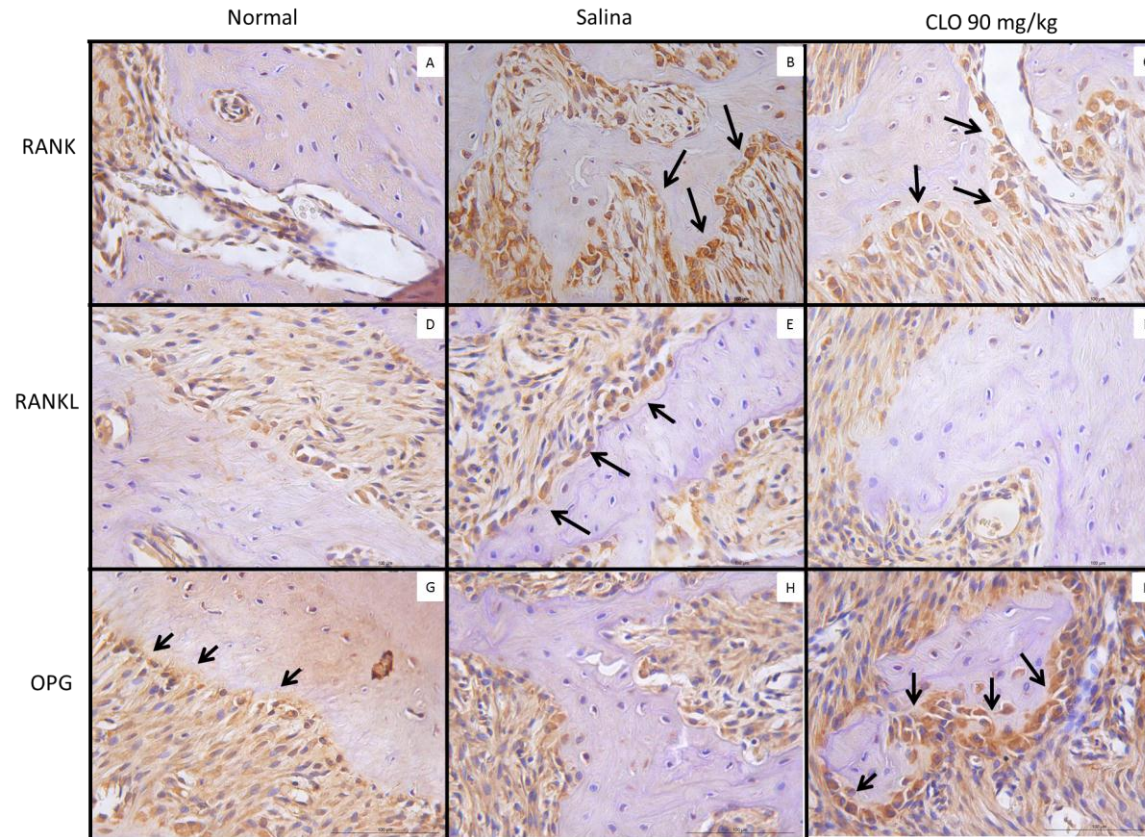
WNT10b (A), beta-catenina (B), DKK-1 (C), RANK (D), RANKL (E), OPG (F). Barras representam média±EPM de 6 animais por grupo. (#) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Normal. (*) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina. (ANOVA e Teste de Bonferroni) ($p < 0,05$).

Figura 11. Efeito da CLO na imunoposição de marcadores da via WNT.



Fotomicrografias mostrando imunomarcção para WNT10b (A, B, C), β -catenina (D, E, F) e DKK-1 (G, H, I), na região interproximal entre primeiro e segundo molar de um periodonto normal (A, D, G), periodonto de animais submetidos à periodontite que receberam SAL (B, H, E), periodonto de animais submetidos à periodontite tratados com CLO (C, F, I). (Ampliação de 400x).

Figura 12. Efeito da CLO na imunoposição de marcadores do eixo RANK-RANKL-OPG.

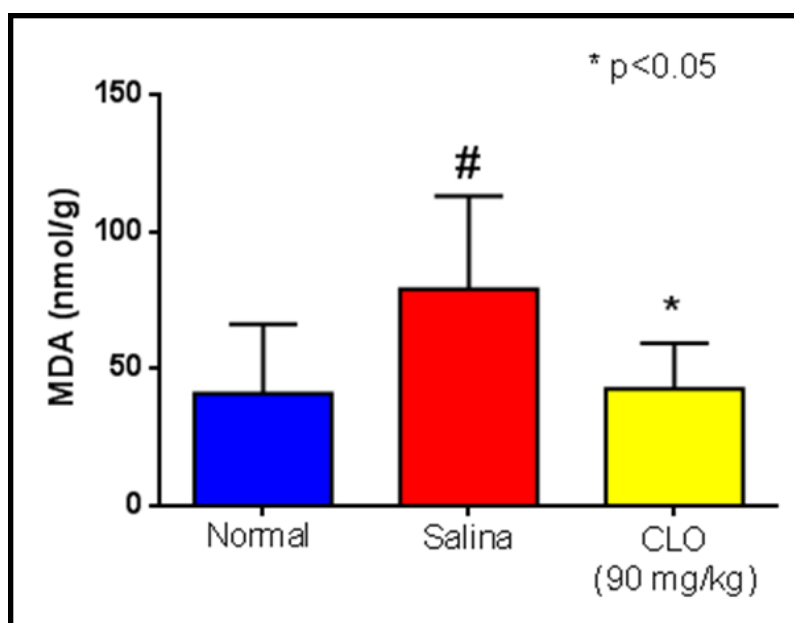


Fotomicrografias mostrando imunomarcção para RANK (A, B, C), RANKL (D, E, F) e OPG (G, H, I) na região interproximal entre primeiro e segundo molar de um periodonto normal (A, D, G), periodonto de animais submetidos à periodontite que receberam SAL (B, E, H), periodonto de animais submetidos à periodontite tratados com CLO (C, F, I). (Ampliação de 400x).

5.6. Efeito da CLO nos Níveis gengivais de Malondialdeído (MDA)

Os animais do grupo Salina apresentaram aumento significativo dos níveis gengivais de MDA quando comparado ao grupo normal. O tratamento com CLO 90 mg/kg foi capaz de prevenir a formação de MDA comparado ao Salina ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Efeito da CLO sobre os níveis gengivais de malonaldeído (MDA).



Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (#) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Normal. (*) indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina. (ANOVA e Bonferroni) ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória crônica de alta prevalência (PETERSEN et al., 2005) que causa destruição de osso alveolar e ligamento periodontal (PIHLSTROM et al., 2005), principalmente devido a hiperresponsividade do hospedeiro (KUHR et al., 2004; TAKAYANAGI, 2005), que gera grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (SHEN et al., 2016), citocinas inflamatórias (GANKOVSKAYA et al., 2016), entre outros fatores, que causam danos aos tecidos.

Para o estudo desta doença, tem sido bem descrito na literatura, o uso de modelos animais, dentre eles destaca-se o modelo de ligadura em ratos. Os ratos são animais de fácil manuseio, baixo custo de manutenção e apresentam similaridades anatômicas com os humanos (OZ & PULEO, 2011). Diversos trabalhos vêm mostrando que este modelo é capaz de reproduzir as principais características da periodontite humana tais como: perda óssea e destruição do ligamento periodontal (ARAÚJO et al., 2013; BEZERRA et al., 2000, 2002; CARVALHO et al., 2013; DE LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; 2012; 2014; 2016; GONÇALVES et al., 2014; LIMA et al. 2004; MARTINS et al., 2016; SOUSA et al., 2016), aumento do estresse oxidativo (DI PAOLA et al., 2004; MENEZES et al., 2012), exacerbação do processo inflamatório (GOES et al., 2010; 2012; LEITÃO et al., 2005; LISBOA et al., 2015), corroborando os achados deste estudo.

Assim, considerando o proeminente papel da inflamação no processo de perda óssea, torna-se interessante o uso de agentes que apresentem ação anti-inflamatória e conseqüentemente antirreabsortiva do tecido ósseo, que sejam de baixo custo e que apresentem uma menor frequência de efeitos adversos, assim como observado em produtos naturais. Neste contexto, a *Calendula officinalis* se destaca como agente modulador da inflamação que pode ser usado como adjuvante ao tratamento da periodontite.

Neste estudo foi observado que o extrato da CLO 90 mg/kg apresentou efeito antirreabsortivo, prevenindo a perda óssea, preservando as microestruturas internas do osso, bem como sua topografia. Apesar de não

haver nada ainda descrito na literatura sobre o efeito do extrato bruto da CLO no tecido ósseo, alguns trabalhos mostram que tal ação se deve a quercetina, um flavonóide presente em abundância no extrato desta planta e que é responsável por grande parte dos efeitos farmacológicos da CLO (SAINI et al., 2012). *In vitro* foi relatado que a quercetina em concentrações de 2 μ M, 5 μ M ou 10 μ M aumentou de forma significativa a diferenciação osteogênica em osteoblastos em cultura (ZHOU et al., 2015). Nas doses de 200 a 500 μ M a quercetina foi capaz de induzir expressão de RNAm para sialoproteína e osteocalcina em cultura de osteoblastos (SATUÉ et al., 2013). *In vivo*, a quercetina, na dose de 100 mg/kg administrada por via subcutânea, inibiu perda óssea em modelo de periodontite (NAPIMOGA et al., 2013), e na dose 150 mg/kg também administrada por via subcutânea aumentou os níveis de osteocalcina sérica (DERAKHSHANIAN et al., 2013; LIANG et al., 2011), e a atividade de fosfatase alcalina em ratos (LIANG et al., 2011), contribuindo para preservação do tecido ósseo.

Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com CLO atuou sobre o eixo RANK-RANKL-OPG reduzindo a imunoexpressão de RANKL e aumentando a de OPG, corroborando assim, com o efeito antirreabsortivo ósseo observado nas análises macroscópicas, por μ -CT e MEV. A reabsorção óssea é regulada pelos níveis de RANK, RANKL e OPG. RANKL se liga ao seu receptor RANK induzindo reabsorção óssea mediada por osteoclastos e OPG inibe a ligação RANKL-RANK inibindo, portanto, a reabsorção óssea (TAKAYANAGY, 2005). A inibição de RANKL e aumento de OPG pode estar relacionado ao efeito antiinflamatório desta planta, uma vez que mediadores como TNF- α e IL-1 β são importantes indutores da expressão de RANKL além de inibir OPG (TAKAYANAGY, 2005). Em dados deste grupo, ainda não publicados, o extrato bruto da CLO causou inibição de IL-1 β e TNF- α no tecido gengival (Dados não publicados, ALEXANDRE, JTM.). A quercetina parece ser a grande contribuidora para o efeito em RANKL e OPG, uma vez que mostrou inibir a liberação de TNF- α , em estudos *in vitro* (BHASKAR & HELEN, 2016). Em modelo de periodontite em ratos induzida por infecção com *A. actinomycetemcomitans*, a quercetina reduziu a expressão de RANKL

(NAPIMOGA et al., 2013). Até onde se sabe não há relatos da avaliação do efeito da CLO ou quercetina na expressão de OPG.

Com relação à via WNT, os resultados desse estudo mostraram, pela primeira vez, o efeito da CLO nesta via de sinalização, aumentando a imunexpressão de WNT10b e beta-catenina, e reduzindo a imunexpressão de DKK-1. Dentre os tipos de proteínas WNT conhecidas em mamíferos (KIKUCHI et al., 2009) se destaca a WNT10b, como modulador positivo da formação óssea (BENNETT et al., 2007; STEVENS et al., 2010). Esta via é regulada pela ação do DKK e Esclerostina (SOST), antagonistas extracelulares, que tem sua expressão aumentada em condições inflamatórias, em resposta a TNF- α e IL-1 β (DIARRA et al., 2007, WANG et al., 2011). Assim um possível mecanismo que explicaria o efeito na CLO na via WNT esta relacionado ao efeito anti-inflamatório desta planta, uma vez que o extrato de CLO foi capaz de inibir de forma significativa TNF- α e IL-1 β , além de diversos outros mediadores inflamatórios (PREETHI et al., 2009).

Ainda sobre o tecido ósseo, por ocasião da MEV foi realizada a análise do osso alveolar usando o EDS. O EDS pode prover análise qualitativa rápida ou quantitativa da composição de elementos químicos, mostrando sua distribuição pela superfície da amostra (NEWBURY & RITCHIE, 2015). Os resultados desse estudo sugerem que não houve diferença na composição química do tecido ósseo entre os diferentes grupos após análise por EDS, o que indica que apesar do processo de reabsorção, o remanescente ósseo preservou os tipos e quantidades de minerais semelhante ao tecido normal.

Além do tecido ósseo, este estudo fez uma análise qualitativa das fibras colágenas. O tratamento com CLO preservou as fibras colágenas observadas na microscopia confocal corroborando assim com outros estudos que mostram que o extrato de CLO reduziu a digestão promovida pela colagenase (MILLÁN et al., 2016), aumentou as concentrações de colágeno (ARO et al., 2015). Especificamente em fibroblastos gengivais, foi demonstrado que a CLO inibiu completamente a degradação do colágeno via inibição metaloproteinase de matriz (MMP)-2 (SAINI et al., 2012). O colágeno é o principal componente do

ligamento periodontal e desempenha papel chave na arquitetura do periodonto (KAKU & YAMAUCHI, 2014). Portanto, a degradação do colágeno é tida como o principal marcador da progressão da doença periodontal (ALMEIDA et al., 2015).

Nos dentes molares de ratos, o ligamento periodontal é normalmente constituído de 35% de fibroblastos e 51% de fibras colágenas (GUILHERME, 2006). O colágeno no ligamento periodontal se apresenta como uma mistura de colágeno tipo I (mais abundante) e tipo III (FREEMAN, 2001; KATCHBURIAN & ARANA, 2004). No entanto os resultados desse estudo sugerem que os animais do grupo normal apresentaram fibras colágenas com birrefringência em tom verde (colágeno tipo III). Tal aspecto pode ser explicado pela idade dos animais utilizados no estudo. De acordo com Zanoni et al. (2013), animais de aproximadamente 90 dias de vida (adultos jovens) apresentavam alta proporção de colágeno tipo III, provavelmente relacionado ao fato desse tipo de colágeno ser o primeiro a ser sintetizado (colágeno jovem). Posteriormente o colágeno tipo III é repostado por colágeno maduro do tipo I nos animais mais velhos (ZANONI et al., 2013). No grupo de animais tratados com CLO, as fibras colágenas preservadas parecem ser de tom esverdeado, ou seja, colágeno tipo III. Apesar dos resultados apresentados pela técnica de coloração de picrossírius red, seria interessante para a confirmação do padrão de organização das fibras reticulares nas amostras dos animais em estudo realizar a técnica de reticulina. Esta técnica permitiria, através da impregnação das fibras por sais de prata, uma observação mais detalhada da organização morfológica das fibras reticulares. Um aumento de colágeno tipo III foi observado na fases iniciais de cicatrização (LI & SAE-LIM, 2007). Além disso, colágeno tipo III é considerado essencial para a fibrillogênese de colágeno tipo I futuramente (LIU et al., 1997). A abundância de colágeno tipo III no ligamento periodontal (LP) pode ser relacionado à função chave no LP, de promover a integridade da interface LP-osso e LP-cimento (SODEK, 1977).

O estresse oxidativo é característico do processo inflamatório, e é considerado um importante fator na patogênese da periodontite (CHAPPEL et

al., 2002; CHAPPEL et al., 2007; CHAPPLE & MATTHEW, 2007; WADDINGTON et al., 2000). As espécies de oxigênio (EROs) produzidas podem reagir com lipídeos produzindo peroxidação lipídica (BARREIROS & DAVID, 2006) levando a liberação de malondialdeído (MDA) (AYALA et al., 2014). Ao investigar os níveis de MDA nos animais com periodontite e tratados com CLO, foi possível observar o efeito anti-oxidante desta planta. Outros estudos confirmam os dados do presente trabalho, pois mostraram redução dos níveis de MDA após tratamento com CLO em ratos com nefrotoxicidade induzida (VERMA et al., 2016), ou colite induzida por ácido acético (TANIDEH et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

Com base nos achados deste estudo, conclui-se que a *Calendula officinalis* preservou fibras colágenas, modulou o estresse oxidativo e principalmente, preveniu a perda óssea atuando sob a via WNT/ β -catenina e, portanto, pode representar um agente promissor como adjuvante no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. et al. Effect of Collagen Matrix Saturation on the Surface Free Energy of Dentin using Different Agents. **J Contemp Dent Pract.**, v. 16, n. 7, p. 531-536, 2015.

ANDRADE, F. R., et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, n. 106, v. 4, p. 548-555, 2008.

ANTUNES, M. V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. **Rev Bras Ciência Farma.**, v. 44, p. 279-278, 2008.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2014, p. 1-31, 2014.

ARAÚJO, A. A. et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **J Clin Periodontol.**, v. 40, n. 12, p. 1104–1111, 2013.

ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. **R. Periodontia.** v.17, n.2, p. 7-13, 2007.

ARO, A. A. et al. Effect of *Calendula officinalis* cream on achilles tendon healing. **Anat Rec (Hoboken).**, v. 298, n. 2, p. 428-435, 2015.

ARORA, D.; RANI, A.; SHARMA, A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. **Pharmacogn Rev.** v. 7, n. 14, p. 179-187, 2013.

ARWEILER, N. B. et al. Nonsurgical treatment of aggressive periodontitis with photodynamic therapy or systemic antibiotics. Threemonth results of a randomized, prospective, controlled clinical study. **Schweiz Monatsschr Zahnmed.**, v. 123, p. 532–544, 2013.

BARON, R. & KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179-192, 2013.

BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim Nova.**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BHASKAR, S.; HELEN, A. Quercetin modulates toll-like receptor-mediated protein kinase signaling pathways in oxLDL-challenged human PBMCs and regulates TLR-activated atherosclerotic inflammation in hypercholesterolemic rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 423, n. 1-2, p. 53-65, 2016.

BENNETT, C.N. et al. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res.**, v. 22, p. 1924–1932, 2007.

BEZERRA, M.M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.

BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, n. 5, p. 613-616, 2002.

BODINE, P. V.; KOMM, B. S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. **Rev Endocr Metab Disord.**, n. 7, v. 1-2, p. 33-39, 2006.

CANALIS, E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 9, p. 575-583, 2013.

CARVALHO, H. F.; TABOGA, S. B.; FELISBINO, S. L. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy of H&E stained sections for the study of elastic fibers in skin and in some skin disorders. **Braz J Morphol Sci.**, v. 16, n. 1, p. 97-103, 1999.

CARVALHO, R. S. et al. Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. **Arch Oral Biol.**, v. 58, n. 1, p. 50-58, 2013.

CARRANZA FA, et al. **Peridodontia clínica**. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 11^a ed, p. 34-54, 2011.

CHAPPLE, I. L. et al. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. **Mol Pathol.**, v. 55, p. 367–373, 2002.

CHAPPLE, I. L. et al. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? **J Clin Periodontol.**, v. 34, p. 103–110, 2007.

CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontology 2000**, v. 43, p. 160–232, 2007.

CINTRA, L. T. et al. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. **International Endodontic Journal**, p. 1-9, 2016.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol.**, v. 79 (8 Suppl), p.1569-1576, 2008.

D'AIUTO, F. et al. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis. **J Dent Res.**, v. 89, n. 11, p. 1241–1246, 2010.

DALCICO, R. et al. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. **J Periodontol.**, v. 84, n. 8, p. 1145-1157, 2013.

DERAKHSHANIAN, H. et al. Quercetin prevents experimental glucocorticoid-induced osteoporosis: a comparative study with alendronate. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 91, n. 5, p. 380-385, 2013.

DI PAOLA, R. et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. **J Dent Res.**, v. 83, n. 4, p. 343-348, 2004.

DIARRA, D. et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. **Nature Medicine**, v. 13, p. 156–163, 2007.

FREEMAN, E. Periodontium. In: TEN CATE AR, Oral Histology: development, structure and function. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 5^a ed, p. 238-271, 2001.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **J Ethnopharmacol.**, v. 126, n. 3, p. 463-467, 2009.

GANKOVSKAYA, L. V. et al. Role of innate immunity factors in periodontitis pathogenesis. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.**, n. 2, p. 100-107, 2016.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Braz Dent J.**, v. 21, n. 3, p. 193-198, 2010.

GOES, P. et al. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol.**, v. 57, n. 11, p. 1537-1544, 2012.

GOES, P. et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **J Periodontal Res.**, v. 49, n. 1, p. 45-54, 2014.

GOES, P. et al. Anti-inflammatory and anti-resorptive effects of atorvastatin on alveolar bone loss in wistar rats. **Braz Dent J.**, v. 27, n. 3, p. 267-272, 2016.

GÓMEZ-FLORIT, M. et al. Identification of quercitrin as a potential therapeutic agent for periodontal applications. **J Periodontol.**, v. 85, n. 7, p. 966-974, 2014.

GONÇALVES, D. C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, p. 442–453, 2014.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**. v. 3, p. 1-15, 2011.

GUENTSCH, A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. **Clin Oral Investig.**, n. 12, v. 4, p. 345-352, 2008.

GUILHERME, A. J. V. Histological evaluation of the periodontal ligament of Wistar rats under the effect of acute hipotireoidism induced by metimazol (tapazol®). **Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**, p. 26-27, 2006.

HARDY, R. et al. Bone loss in inflammatory disorders. **J Endocrinol.**, v. 201, n. 3, p. 309-320, 2009.

HIENZ, S. et al. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. **Journal of Immunology Research**. Hindawi Publishing Corporation. v. 2015, p. 1-10, 2015.

HILL, T.P. et al. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. **Dev Cell.**, v. 8, p. 727-738, 2005.

HSU, S. M. et al. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem.**, v. 29, p. 1349-1353, 1981.

KAYAL R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Periodontium. In. **Oral Histology and Embriology.**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed, p. 275-326, 2004.

KHOSLA S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, p. 5050–5055, 2001.

KILKENNY C, et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. **J Pharmacol Pharmacother.**, v. 1, n. 2, p. 94-99, 2010.

KOBAYASHI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **J Biochem.**, v. 159, n. 4, p.387-392, 2016.

KUBOTA, T.; MICHIGAMI, T.; OZONO, K. Wnt signaling in bone metabolism. **J Bone Miner Metab.**, v. 27, n. 3, p. 265-271, 2009.

KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res.**, v.39, p. 101-106, 2004.

KAKU, M.; YAMAUCHI M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. **J Prosthodont Res.**, v. 58, n. 4, p.193-207, 2014.

KIKUCHI, A. Wnt signaling; its abnormalities and diseases. **Seikagaku.** v. 81, n. 9, p. 780-92, 2009.

LAUTEN, J. D. et al. A clinical study: Melaleuca, Manuka, Calendula and green tea mouth rinse. **Phytother Res.**, v. 19, n. 11, p. 951-957, 2005.

LEITÃO, R. F. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**. v. 8, n. 3, p. 167, 2016.

LI, Z.; SAE-LIM, V. Comparison of acidic fibroblast growth factor on collagen carrier with calcium hydroxide as pulp capping agents in monkeys. **Dent Traumatol.**, v. 23, n. 5, p. 278-286, 2007.

LIU, X. et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 94, p. 1852–1856, 1997.

LIANG, W. et al. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. **Eur J Pharmacol.**, v. 670, n. 1, p. 317-324, 2011.

DE LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, 2000.

LIMA, V. et al. 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.

LISBOA, M. R. et al. Effects of Electroacupuncture on Experimental Periodontitis in Rats. **J Periodontol.**, v. 5, p. 1-19, 2015.

LÓPEZ DE LEON, N.A.; ROJKIND, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. **J Histochem Cytochem.**, v.33, p.737-743, 1985.

LU H, et al. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. **Int J Clin Exp Pathol.**, v.7, n. 2, p. 640-647, 2014.

MACHADO, M. A. Management of two cases of desquamative gingivitis with clobetasol and *Calendula officinalis* gel. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** v. 154, n. 4, p. 335-338, 2010.

MARTINS, C. M. et al. Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vitro and in vivo study. **Braz oral res.**, v.30, n.1, p. 1-6, 2016.

MARTINS, C. S. et al. Topical HPMC/S-Nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. **Plos one.**, v.11, n. 4, p. 1-19, 2016.

MACIEL-OLIVEIRA, N. et al. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 112, n. 2, p. 170-179, 2011.

MENEZES, A. M. et al. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 83, n. 4, p. 514-521, 2012.

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

MILLÁN, D. et al. Preclinical evaluation of collagen type I scaffolds, including gelatin-collagen microparticles and loaded with a hydroglycolic *Calendula officinalis* extract in a lagomorph model of full-thickness skin wound. **Drug Deliv Transl Res.**, v. 6, n. 1, p. 57-66, 2016.

MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnol Annu Rev.**, v. 11, p. 227-256, 2005.

MORIKAWA, K. et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sci.**, v. 74, n. 6, p. 709-721, 2003.

NAPIMOGA, M. H. et al. Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model. **J.Nat.Prod.**, v. 76, p. 2316–2321, 2013.

NEWBURY, D. E.; RITCHIE, N. W. Performing elemental microanalysis with high accuracy and high precision by scanning electron microscopy/silicon drift detector energy-dispersive X-ray spectrometry (SEM/SDD-EDS). **J Mater Sci.**, v. 50, n. 2, p. 493-518, 2015.

NEVILLE, B. W. et al. Patologia oral & maxilofacial. **Editora Guanabara Koogan**, 2^a ed, p. 145-151, 2004.

OKAMOTO, K.; TAKAYANAGI, H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 13, n. 3, p. 219, 2011.

OLIVEIRA, T. et al. Allium cepa L. and Quercetin Inhibit RANKL/Porphyromonas gingivalis LPS-Induced Osteoclastogenesis by Downregulating NF- κ B Signaling Pathway. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

ORIÁ, R. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

PARENTE, L. M. et al. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of Calendula officinalis L. Growing in Brazil. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

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. et al. Periodontal diseases. **Lancet.**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005.

PREETHI, K.C.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Anti-inflammatory activity of flower extract of Calendula officinalis Linn. and its possible mechanism of action. **Indian J Exp Biol.**, v. 47, n. 2, p. 113-120, 2009.

RAUNER, M.; SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. **Age (Dordr)**, n. 30, v. 4, p. 273-282, 2008.

RAUNER, M. et al. Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 160, n. 2, p. 114-125, 2013.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 11, n. 3, p. 234-250, 2012.

RING, A.; KIM, YM.; KAHN, M. Wnt/Catenin Signaling in Adult Stem Cell Physiology and Disease. **Stem Cell Rev.**, v. 10, n. 4, p. 512–525, 2014.

SATUÉ, M. et al. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. **Biochem Pharmacol.**, v. 86, n. 10, p. 1476-1486, 2013.

SAINI, P. et al. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. **Homeopathy**, v. 101, n. 2, p. 92-98, 2012.

SHEN, Y. X. et al. Oxidative stress and antioxidant therapy of chronic periodontitis. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v. 51, n. 7, p. 442-446, 2016.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. **Vet Med Nauki.**, v. 18, p. 87–94, 1981.

SODEK, J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. **Arch Oral Biol.**, v. 22, p. 655–665, 1977.

SOUKOS N. S.; GOODSON J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol 2000**, v. 55, p. 143–166, 2011.

SOUSA L. H. et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Periodontol.**, v. 87, n. 10, p. 1206-1216, 2016.

STEVENS, et al. Wnt10b Deficiency Results in Age-Dependent Loss of Bone Mass and Progressive Reduction of Mesenchymal Progenitor Cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 10, p. 2138–2147, 2010.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodont Res**, v. 40, p. 287-293, 2005.

TANIDEH, N. et al. Healing acceleration of acetic acid-induced colitis by marigold (*Calendula officinalis*) in male rats. **Saudi J Gastroenterol.**, v. 22, n.1, p. 50-56, 2016

VERMA, P.K. et al. Total antioxidant and oxidant status of plasma and renal tissue of cisplatin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of *Calendula officinalis* Linn. **Ren Fail.**, v. 38, n. 1, p. 142-150, 2016.

WADDINGTON, R.J.; MOSELEY, R.; EMBERY, G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. **Oral Dis.**, v. 6, p. 138–151, 2000.

WANG, S. Y. et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**. v. 38, p. 821–827, 2011.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. **Front Immunol.**, v. 5, p. 511, 2014.

ZANONI, J. N. et al. Histological evaluation of the periodontal ligament from aged wistar rats supplemented with ascorbic acid. **An Acad Bras Ciênc.**, v. 85, n. 1, p. 327-335, 2013.

ZHENG, W. et al. Periodontitis promotes the proliferation and suppresses the differentiation potential of human periodontal ligament stem cells. **Int J Mol Med.**, 36, n. 4, p. 915-922, 2015.

ZHOU, Y. et al. The Effect of Quercetin on the Osteogenic Differentiation and Angiogenic Factor Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

ZUPAN, J. et al. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 23, n. 1, p. 43-63, 2013.

ANEXO A



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ Estudo da relação entre Treg e o papel das interleucinas (IL) -17 e -23 sobre as vias Rank-rank-opg e WNT/Beta-catetina na periodontite experimental“, protocolo nº 38/15, sob responsabilidade de Virgínia Carneiro Girão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (excerco o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 29/04/2015.

Vigência do projeto	01/02/2015 a 31/12/2015
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	48
Peso/Idade	180-200g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de maio de 2015

Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734

ANEXO B



De: Mapric Produtos Farmacocosméticos Ltda

Para:

Atenção:

Assunto: Extrato Aquoso Calêndula

A Mapric Produtos Farmacocosméticos Ltda., através de seu Departamento Técnico, informa que o insumo Extrato Aquoso Calêndula possui em sua composição os componentes abaixo descritos:

Componentes	INCI Name	CAS Number	Concentração (%)
Calêndula (Calêndula <i>officinalis</i>)	N.A	N.A	5,0 - 10,0
Álcool Etílico	Alcohol	64-17-5	10,0 - 20,0
Metilparabeno	Methylparaben	99-76-3	0,1 - 0,2
Água	Water	7732-18-5	80,0 - 100,0

Estamos à disposição para eventuais esclarecimentos.

Atenciosamente,

Luiz Gustavo M. Matheus
Diretor Técnico

Valdir M. Caia,
Responsável Técnico