

ADRIANA MAGALHÃES ANDRADE DE MENEZES

**ESTUDO DO PAPEL DO S-NITROSOGLUTATIONA NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL E NA INFLAMAÇÃO AGUDA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará - UFC

FORTALEZA

2010

M51e Menezes, Adriana Magalhães Andrade

Efeito do papel do S-Nitrosoglutationa na doença periodontal experimental e na inflamação aguda: S-Nitrosoglutationa na doença periodontal / Adriana Magalhães Andrade de Menezes. – Fortaleza-Ce, 2010.
157 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; Fortaleza-Ce, 2010

**1. S-Nitrosoglutationa 2. Periodontite 3. Inflamação
4. Óxido Nítrico I. Brito, Gerly Anne de Castro (Orient.)
II. Título.**

CDD: 617.632

ADRIANA MAGALHÃES ANDRADE DE MENEZES

**ESTUDO DO PAPEL DO S-NITROSOGLUTATIONA NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL E NA INFLAMAÇÃO AGUDA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof^a. Dr^a. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof^a. Dr^a. Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará - UFC

**Aos meus pais, Braga e Marta, pelo imenso amor,
incentivo e apoio.**

**Ao meu marido, João Marcelo, e meus filhos,
João Henrique e Renan, por tudo.**

“Quanto mais me aprofundo nas ciências, mais
perto eu chego de Deus.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

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

À Professora Gerly Anne de Castro Brito, pela firme orientação neste trabalho, bem como pela amizade, incentivo, paciência e presteza.

Ao Professor Ronaldo, pela acolhida em seu laboratório e pela visão de pesquisa que sempre me transmitiu.

À Roberta Dalcico, cuja participação foi decisiva e indispensável.

À Antoniella, pela valiosa e fundamental ajuda neste trabalho.

Ao Professor Marcelo Oliveira e à Gabriela Souza, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela gentileza no fornecimento do medicamento usado neste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica, Luis Fernando, Natália, Samara, André, pela valorosa contribuição durante as pesquisas.

Aos colegas de laboratório (LAFICA), pelo companheirismo e convivência prazerosa.

À Vandinha, pela presteza em sempre ajudar.

Ao Ivan e à Socorro, pela dedicação na confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, pela disposição em ajudar.

LISTA DE FIGURAS

1	Desenho esquemático do dente com seu periodonto	21
2	Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais são definidos pela resposta do hospedeiro perante o biofilme bacteriano	24
3	Etapas da síntese de NO e L-citrulina	34
4	A via L-arginina-óxido nítrico	36
5	S-nitrosoglutationa	45
6	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) na doença periodontal experimental (DPE) em ratas	68
7	Aspecto macroscópico de maxilas de ratas normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina, PVP ou GSNO	69
8	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratas normais ou submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	72
9	Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos à DPE que receberam salina, PVP ou GSNO e de animal normal sem DPE na coloração hematoxilina-eosina (HE)	74
10	Fotomicrografias de periodonto de animais submetidos à DPE, que receberam salina, PVP ou GSNO e de animal normal sem DPE na coloração Tricrômio de Mallory	78
11	Imunohistoquímica para metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO	81
12	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	84
13	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) em gengivas de ratas normais ou submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	86
14	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	87
15	Imunohistoquímica para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear-	89

	κB (NF-κB) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO	
16	Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO	92
17	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração do nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratas submetidos à doença periodontal experimental (DPE)	95
18	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutaciona reduzida (GSH) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	97
19	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de malondialdeído (MDA) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	98
20	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a migração de leucócitos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite	100
21	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a migração de neutrófilos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite	101
22	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal	103
23	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1β) no exsudato peritoneal	105
24	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) no exsudato peritoneal	106
25	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no exsudato peritoneal	108
26	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutaciona reduzida (GSH) no exsudato peritoneal	110
27	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de malondialdeído (MDA) no exsudato peritoneal	111
28	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratas	113
29	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido de pata de ratas após injeção de carragenina	115
30	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1	117

	beta (IL-1 β) no tecido de pata de ratas após injeção de carragenina	
31	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no tecido de pata de ratas após injeção de carragenina	118
32	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no tecido da pata de ratas que receberam carragenina	120
33	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de glutaciona reduzida (GSH) no tecido da pata de ratas que receberam carragenina	122
34	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de malondialdeído (MDA) no tecido da pata de ratas após injeção de carragenina	123
35	Fotomicrografias do tecido da pata de animal normal e de ratas que receberam carragenina subplantar e tratados com salina, PVP ou GSNO	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BH ₄	tetrahidrobiopterina
BSA	Soro de albumina bovina
COX-	Cicloxygenase
DAB	3,3-diaminobenzidine-peróxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPE	Doença periodontal experimental
EPM	Erro padrão da média
EDRF	Fator relaxante derivado de endotélio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FAT	Fosfatase alcalina total
FMN	Flavina mononucleotídeo
g	grama
GCs	guanilato ciclase solúvel
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
GMPc	Guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GSH	Glutationa
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSHPx	Glutationa peroxidase
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HE	Hematoxilina-eosina
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico
HOCl	Ácido perclórico
HTAB	Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
i.p.	intraperitoneal
IPO	Índice de perda óssea
LT	leucotrienos
M	Molar
mm ²	Milímetro quadrado
mmol l ⁻¹	Milimol por litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMP-	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina-dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NHA	N ^G -hidroxi-L-arginina
nm	nanômetro
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
N ₂ O ₃	trióxido dinitrogênio
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Íon superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPG	Osteoprotegerina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada
pg	picograma
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PVA	Polivinil álcool
PVP	Polivinil pirrolidona
RANK	receptor-ativador NF-κB
RANKL	RANK ligante
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio
r.p.m.	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RSH	Tiol
RSNO	S-nitrosotióis
SOD	superóxido dismutase
TIMP-	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TGF-β	Fator transformador de crescimento-β
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	tromboxano
VCAM-1	molécula de adesão da célula vascular-1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
°C	Graus Célsius
μL	Microlitro
μg	micrograma
μM	micromolar

RESUMO

ESTUDO DO PAPEL DO S-NITROSOGLUTATIONA NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL E NA INFLAMAÇÃO AGUDA

A periodontite, importante causa de perda dentária em adultos, é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela reabsorção do osso alveolar e das fibras colágenas, bem como destruição do cemento. O S-nitrosoglutationa (GSNO) é considerado um doador de NO e atua como reservatório de NO *in vivo*. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do GSNO na doença periodontal experimental (DPE). A DPE foi induzida passando-se um fio de náilon 3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo de ratos Wistar fêmeas. Os animais foram tratados com 50 µl GSNO (0,5, 2 e 10 mmol L⁻¹), PVP (polivinil pirrolidona, diluente do GSNO) ou salina subgingivalmente 30 minutos antes da indução da periodontite e diariamente até o dia do sacrifício no 11º dia. Foram analisados os seguintes parâmetros: índice de perda óssea (IPO), fosfatase alcalina óssea (FAO), mieloperoxidase (MPO), dosagem de citocinas (IL-1β e TNF-α), malondialdeído (MDA), glutationa reduzida (GSH), conteúdo de nitrito/nitrato (NOx) e imunohistoquímica para metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8), óxido nítrico sintase induzida (NOSi) e fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB). A fim de confirmar o efeito antiinflamatório e antioxidante do GSNO foram utilizados os modelos de peritonite e edema de pata. A peritonite foi induzida através da injeção de 1mL de carragenina ou salina (500 µL) na cavidade peritoneal 1 hora após a administração intraperitoneal (i.p.) de salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹). Após 4 horas, os animais foram sacrificados para coleta do fluido peritoneal. Para o edema de pata, salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, i.p.) foram administrados uma hora antes da injeção de 0,1 mL de carragenina (500µg/pata) ou salina por via subplantar (sp) na pata traseira esquerda de cada rata. O sacrifício dos animais ocorreu 4 horas após a injeção do estímulo inflamatório. Os seguintes parâmetros foram analisados: volume do edema da pata, migração de leucócitos para cavidade peritoneal, MPO, IL-1β, TNF-α, GSH e MDA. O GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ reduziu o IPO, MPO, citocinas pró-inflamatórias IL-1β and TNF-α, nitrito/nitrato, e aumentou GSH. O GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ também diminuíram a imunomarcagem para MMP-1/-8, NOSi e NF-κB. Contudo, apenas GSNO 2 mmol L⁻¹ diminuiu MDA. Resultados semelhantes foram encontrados na peritonite e no edema de pata, acrescido de que o GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ diminuiu tanto o volume do edema de pata como a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal. Esses resultados mostram que o GSNO possui efeito protetor na doença periodontal experimental, no edema de pata e na peritonite através da redução da inflamação e do estresse oxidativo.

Palavras-chave: S-Nitrosoglutationa, óxido nítrico, periodontite, inflamação.

ABSTRACT

STUDY OF THE PAPER OF S-NITROSOGLUTHATHIONE IN EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE AND IN ACUTE INFLAMMATION

Periodontitis, a relevant cause of teeth loss in adults, is a chronic inflammatory disease characterized by alveolar bone resorption and collagen fibers and cementum destruction. S-nitrosogluthathione (GSNO) is considered to be an NO donor and to act as a reservoir of NO *in vivo*. The objective of this study was to investigate the effect of GSNO in experimental periodontal disease (EPD). EPD was induced by a nylon thread ligature surgically placed around the cervix of the second left maxillary molars of female Wistar rats. Animals were treated with 50µL GSNO (0,5, 2 or 10 mmol L⁻¹), PVP or saline subgingivally 30 minutes before periodontitis induction and daily until sacrifice on 11th day. The parameters analysed were alveolar bone loss (ABL), bone alkaline phosphatase, myeloperoxidase (MPO), cytokines levels (IL-1β and TNF-α), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) content, nitrite/nitrate levels, and immunohistochemistry for metalloproteinase (MMP-1/8), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nuclear factor-κB (NFκB). In order to confirm the anti-inflammatory and antioxidant effect of GSNO was used the peritonitis and paw edema models. Peritonitis was induced by injection of 1 mL carrageenan (500 µL/cavity) or saline ip in naïve rats or in rats that received saline, PVP or GSNO (0,5, 2 or 10 mmol L⁻¹, ip) 1 hour prior to the carrageenan. After 4 hours, the animals were sacrificed for collection of the fluid peritoneal. Paw edema was induced by subplantar injection of carrageenan (500 µg/paw). Saline, PVP or GSNO (0,5, 2 or 10 mmol L⁻¹, ip) were administered 1 hour before the inflammatory stimuli into the left hind paw. The animals were sacrificed 4 hours after the ip injection of carrageenan. The parameters analysed were volume of paw edema, migration of leukocytes for cavity peritoneal, MPO, cytokines (IL-1β and TNF-α), GSH and MDA. The GSNO in the concentrations of 0,5 and 2 mmol L⁻¹ reduced ABL, MPO, inflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α), nitrite/nitrate, and it increased GSH. GSNO 0,5 and 2 mmol L⁻¹ also decreased the demarcation to MMP-1/-8, NOSi and NF-κB. However, just GSNO 2 mmol L⁻¹ reduced MDA. Results similar were found in the peritonitis and in the paw edema, added to the fact that GSNO 0,5 and 2 mmol L⁻¹ decreased the volume of the paw edema and the migration of leukocytes and neutrophils to the cavity peritoneal. These results show that GSNO has a protective effect on the experimental periodontal disease, peritonitis and paw edema by reducing inflammation and oxidative stress.

Keywords: S-nitrosogluthathione, nitric oxide, periodontitis, inflammation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Periodonto	19
1.2	Doença Periodontal	21
1.2.1	Doença periodontal e colágeno	29
1.3	Estresse Oxidativo	31
1.4	Óxido Nítrico	33
1.4.1	Biossíntese do óxido nítrico	33
1.4.2	Ações do óxido nítrico	36
1.4.3	Óxido nítrico e tecido ósseo	39
1.5	S-Nitrosotiol e S-Nitrosoglutationa	42
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Animais	52
3.2	Aparelhos e instrumentos laboratoriais	52
3.3	Fármacos, anticorpos, soluções, líquidos e corantes utilizados	53
3.3.1	Síntese de S-nitroso-glutationa (GSNO)	55
3.4	Indução da doença periodontal experimental	55
3.5	Grupos experimentais	56
3.5.1	Grupo <i>naive</i>	56
3.5.2	Grupo tratado com Salina	56
3.5.3	Grupo tratado com PVP	56
3.5.4	Grupos tratados com GSNO	57
3.6	Parâmetros Avaliados	57
3.6.1	Análise do Índice de Perda Óssea Alveolar	57
3.6.2	Dosagem sérica da variação da fosfatase alcalina óssea	57
3.6.3	Análise Histopatológica	58
3.6.4	Dosagem de mieloperoxidase	59
3.6.5	Dosagem de citocinas	60
3.6.6	Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase	61

	induzida (NOSi), para metaloproteinase-1/-8 e para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear- κ B (NF- κ B)	
3.6.7	Dosagem de nitrito/nitrato	62
3.6.8	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)	62
3.6.9	Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	63
3.7	Edema de Pata Induzido por Carragenina	63
3.8	Peritonite Induzida por Carragenina	64
3.9	Análise Estatística	65
4	RESULTADOS	66
4.1	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a perda óssea alveolar na DPE induzida por corpo estranho em ratas	67
4.1.1	Estudo do Índice de Perda Óssea	67
4.1.2	Aspecto macroscópico da hemiarcada superior esquerda de animais sem e com doença periodontal experimental (DPE)	67
4.2	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)	71
4.3	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas	73
4.3.1	Tabela dos escores histopatológicos	73
4.4	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações das fibras colágenas em ratas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratas	77
4.5	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8) pelo método de imunohistoquímica	80
4.6	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a medida da atividade de mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas	83
4.7	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de citocinas nas gengivas de ratas	85
4.7.1	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) nas gengivas de ratas	85
4.7.2	Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator	85

	de necrose tumoral alfa (TNF- α) nas gengivas de ratas	
4.8	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a imunomarcção para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear- κB (NF-κB) pelo método de imunohistoquímica	88
4.9	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a imunomarcção para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) pelo método de imunohistoquímica	91
4.10	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) em gengivas de ratas	94
4.11	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de glutaciona reduzida (GSH) em gengiva de ratas	96
4.12	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em gengivas de ratas	96
4.13	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a migração de leucócitos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite induzida por carragenina	99
4.13.1	Efeito do GSNO sobre a migração de leucócitos totais no exsudato peritoneal	99
4.13.2	Efeito do GSNO sobre a migração de polimorfonucleares no exsudato peritoneal	99
4.14	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal em modelo de peritonite	102
4.15	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a produção de citocinas no exsudato peritoneal em modelo de peritonite induzida por carragenina	104
4.15.1	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no exsudato peritoneal	104
4.15.2	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no exsudato peritoneal	104
4.16	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no exsudato peritoneal	107
4.17	Efeito do S-nitrosoglutaciona (GSNO) sobre a concentração	109

	de glutathiona reduzida (GSH) no exsudato peritoneal	
4.18	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no exsudato peritoneal	109
4.19	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratas	112
4.20	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido de pata de ratas após injeção de carragenina	114
4.21	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a produção de citocinas no tecido da pata de ratas em modelo de edema de pata induzido por carragenina	116
4.21.1	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no edema de pata induzido por carragenina	116
4.21.2	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no edema de pata induzido por carragenina	116
4.22	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no tecido da pata de animais após injeção de carragenina	119
4.23	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em tecido de pata de ratas que receberam carragenina	121
4.24	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em tecido de pata de animais após injeção de carragenina	121
4.25	Efeito do S-nitrosoglutathiona (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas no tecido da pata de animais que receberam carragenina subplantar	124
5	DISCUSSÃO	127
6	CONCLUSÕES	140
REFERENCIAS		142

1 INTRODUÇÃO

1.1 Periodonto

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente), também chamado de “aparelho de inserção” ou “aparelho de suporte dos dentes”, forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeita a mudanças morfológicas relacionadas a modificações funcionais e do meio bucal (LINDHE *et al.*, 2010). Ele compreende uma estrutura dinâmica, cuja função é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares, bem como manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. É composto por gengiva (G), ligamento periodontal (LP), cemento radicular (C) e osso alveolar (OA) (Figura 1). A estrutura e função dos tecidos que compõem o periodonto são mutuamente dependentes, mantendo entre si, uma harmoniosa relação sob condições normais (HOLMSTRUP, 2001; LINDHE *et al.*, 2010).

A gengiva é o elemento do periodonto que se sobrepõe ao osso alveolar e envolve toda a porção cervical do dente. Constitui o único dos tecidos periodontais que é diretamente visível à inspeção sob condições normais. Divide-se em gengiva marginal livre e gengiva inserida. A gengiva marginal livre possui cor rósea, consistência firme e, frequentemente, é arredondada de modo a formar uma pequena invaginação ou sulco entre o tecido gengival e o dente (sulco gengival). Em continuidade a esta, há a gengiva inserida, a qual possui uma textura firme, aspecto de casca de laranja e estende-se em direção apical até a junção mucogengival, onde a gengiva funde-se com a mucosa oral (Figura 1). O tecido conjuntivo gengival é composto principalmente por densas redes de fibras colágenas que funcionam de forma interdependente, fornecendo firmeza à gengiva e, também, promovendo a inserção desta ao cemento e ao osso alveolar subjacente (HOLMSTRUP, 2001).

O ligamento periodontal é constituído de tecido conjuntivo denso, bastante vascularizado e contém células, substância fundamental amorfa, nervos e ilhas epiteliais. As fibras colágenas do ligamento periodontal ligam o cemento radicular ao osso alveolar e situam-se no estreito espaço entre estes dois, promovendo, assim, 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. Além destas, existem também algumas fibras elásticas, as quais estão

incorporadas nas paredes dos vasos sanguíneos arteriais (HOLMSTRUP, 2001; LINDHE *et al.*, 2010).

O cimento radicular consiste em um tecido calcificado especializado que recobre a superfície radicular dos dentes. Sua função é prender as fibras do ligamento periodontal à superfície radicular, bem como contribuir para o processo de reparo após danos à superfície radicular. Cerca de 50% do cimento é constituído por material orgânico, tais como proteoglicanas, glicoproteínas e colágeno, sendo que este último compreende a grande maioria. Sua porção mineral é composta por cálcio e fósforo, que estão presentes na forma de hidroxiapatita. O cimento não contém vasos (sanguíneos e linfáticos), não possui inervação, não sofre remodelação nem reabsorção fisiológicas, contudo, sofre deposição contínua ao longo da vida (HOLMSTRUP, 2001; LINDHE *et al.*, 2010).

O processo alveolar é um tecido mineralizado innervado e vascularizado. Compreende a parte da maxila e da mandíbula que formam os alvéolos dentários e proporciona suporte para as raízes dos dentes. Esses processos são dependentes da presença dos dentes e estão sujeitos à reabsorção quando a unidade dental é perdida. O osso alveolar propriamente dito é contínuo com o processo alveolar e forma a delgada lâmina óssea que reveste o alvéolo dentário. O osso alveolar está continuamente sofrendo remodelação como resultado de sua adaptação às necessidades funcionais (HOLMSTRUP, 2001; LINDHE *et al.*, 2010).

O cimento radicular, o ligamento periodontal e o osso alveolar constituem o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir e absorver as forças geradas pela mastigação e outros contatos dentários (LINDHE *et al.*, 2010).

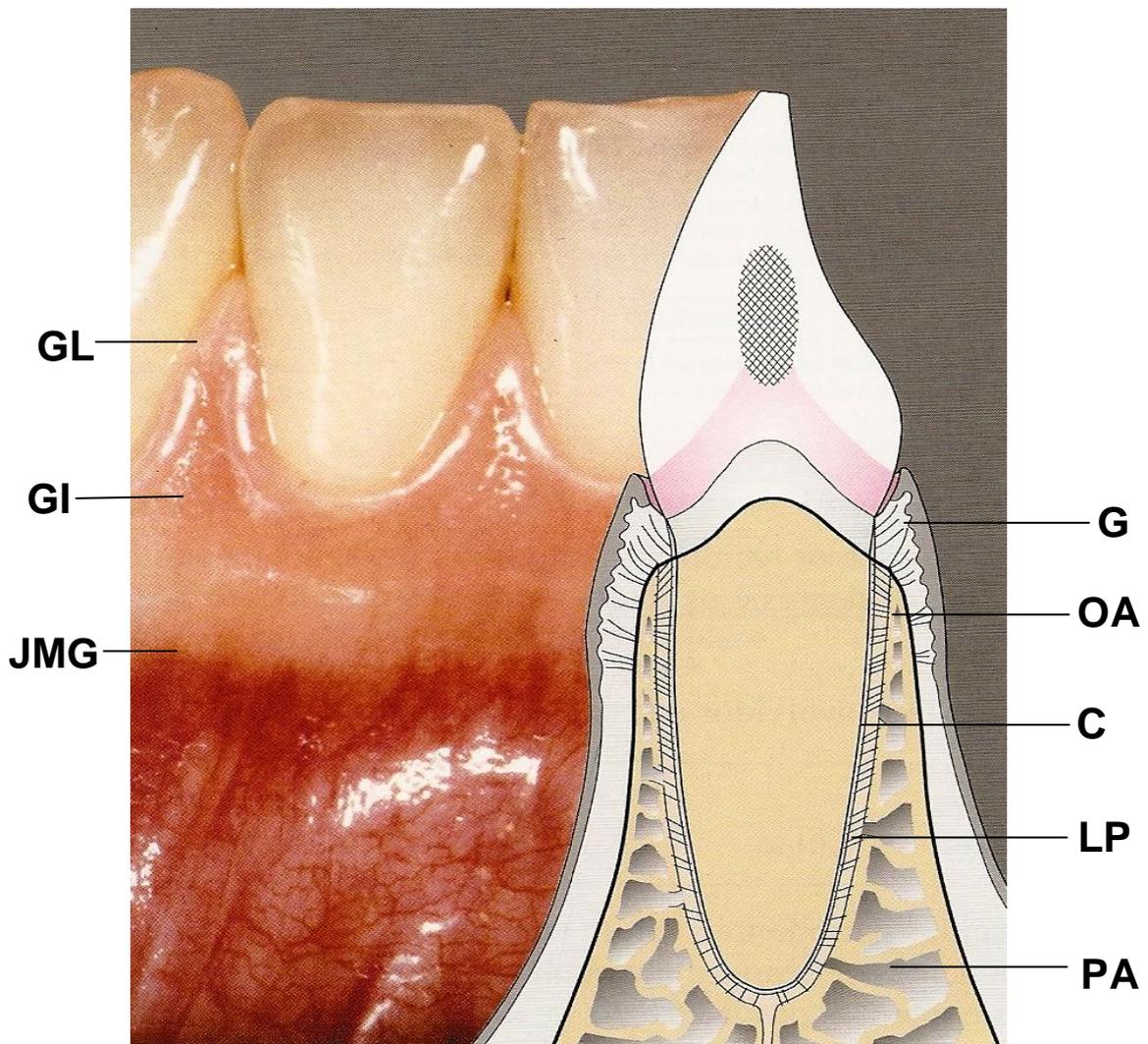


Figura 1: Desenho esquemático do dente com seu periodonto. G: gengiva, **C:** cimento, **LP:** ligamento periodontal, **OA:** osso alveolar, **PA:** processo alveolar, **GL:** gengiva livre; **GI:** gengiva inserida; **JMG:** junção mucogengival.

Fonte: WOLF *et al.*, 2006.

1.2 Doença periodontal

As doenças periodontais possuem alta prevalência na população mundial e manifestam-se, principalmente, em duas entidades distintas, a saber: a gengivite induzida pela placa 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 (PIHLSTROM *et al.*, 2005; KINNEY *et al.*, 2007).

Quando a inflamação se estende às estruturas periodontais mais profundas, ocorrendo perda de inserção com destruição do colágeno e reabsorção óssea, caracteriza-se a periodontite (PIHLSTROM *et al.*, 2005; KINNEY *et al.*, 2007). Se a doença não for tratada, a destruição óssea continua levando à mobilidade do dente com perda dentária subsequente (KINNEY *et al.*, 2007).

A periodontite, a qual é considerada uma importante causa de perda dentária em adultos, constitui um fator de risco significativa para as doenças cerebrovasculares, diabetes tipo II, parto prematuro e doenças cardiovasculares (PIHLSTROM *et al.*, 2005; PANJAMURTHY *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2006). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças periodontais apresentam alta incidência e prevalência na população brasileira, onde apenas 22% dos adultos e 8% dos idosos apresentam saúde periodontal (BRASIL, 2004). 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 cuidam e, conseqüentemente, conservam seus dentes naturais também tem se tornado cada vez maior (GOLUB *et al.*, 1998).

A boca possui uma considerável microbiota vivendo em simbiose com o hospedeiro saudável. Estima-se que mais de 700 espécies bacterianas colonizam a boca, das quais 400 colonizam a área subgengival (LÓPEZ-PÍRIZ *et al.*, 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 *et al.*, 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, vão dar lugar a uma microbiota bacteriana predominantemente gram-negativa, anaeróbica e proteolítica (LÓPEZ-PÍRIZ *et al.*, 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 subgengival como também na doença periodontal severa, 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 correlacionados com o aumento da profundidade da bolsa periodontal e da perda progressiva do ligamento periodontal (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: (1) diretamente, através da invasão do tecido pelos mesmos, os quais liberam substâncias nocivas que induzem morte celular e necrose tecidual; e, (2) indiretamente, através da ativação de células inflamatórias que produzem e liberam mediadores com potentes atividades pró-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 (VAN DYKE; SERHAN, 2003; HONDA *et al.*, 2006; BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009). 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 imune-inflamatória 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 *et al.*, 2005) (Figura 2).

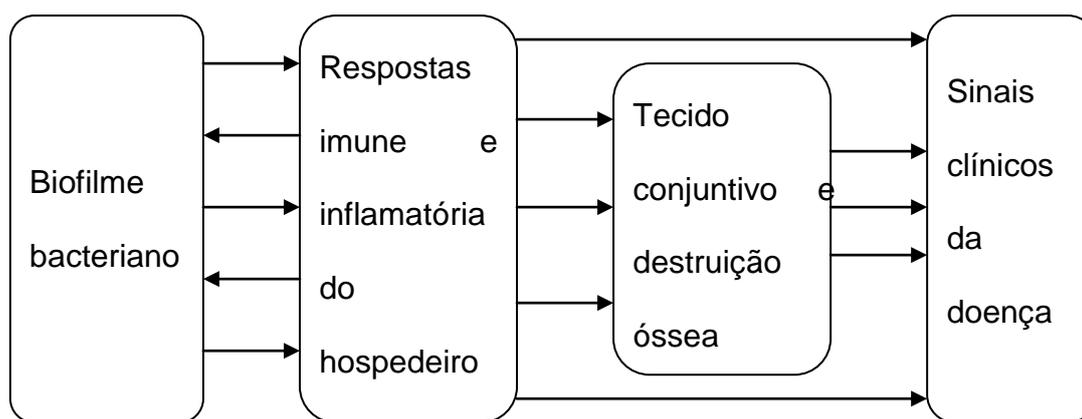


Figura 2: Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais são definidos pela resposta do hospedeiro perante o biofilme bacteriano.

Fonte: KORNMAN, 2001.

A primeira linha de defesa contra a bactéria periodontopatogênica é formada pelos polimorfonucleares neutrófilos (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 (ÖVER *et al.*, 1993; MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997; SATO *et al.*, 2008; BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009). 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 (BRADLEY *et al.*, 1982; ÖVER *et al.*, 1993; YAMALIK *et al.*, 2000; MALLE *et al.*, 2007).

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 (ÖVER *et al.*, 1993; BORGES JR *et al.*, 2007;

MARCACCINI *et al.*, 2010). 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 (ÖVER *et al.*, 1993; BORGES JR *et al.*, 2007; MARCACCINI *et al.*, 2010).

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 (LIU *et al.*, 2001; VAN DYKE; SERHAN, 2003).

As citocinas (etimologicamente, “proteína celular”) são proteínas solúveis, as quais transmitem informações de uma célula à outra através de mecanismos autócrinos ou parácrinos. Em geral, as citocinas atuam objetivando a eliminação de microrganismos parasitas e a reparação do 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 (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000; KENDALL *et al.*, 2001; OATES *et al.*, 2002).

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 sinergisticamente estimulando a degradação da matriz de tecido conjuntivo, recrutamento e/ou ativação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (KJELDSEN *et al.*, 1995; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000; LIU *et al.*, 2001). 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).

A interleucina-1 β (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, ceratinócitos e células epiteliais. Esta 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 (KOBAYASHI *et al.*, 1999; BOCH *et al.*, 2001; KELES *et al.*, 2005; LINS *et al.*, 2007).

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 *et al.*, 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). A IL-1 β também 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 fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF), prostaciclina (PGI₂) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (PREISS; MEYLE, 1994).

O fator de necrose tumoral alfa (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; ROSSOMANDO; WHITE, 1993; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SANDROS *et al.*, 2000). O TNF- α exerce importante papel na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Ele estimula a produção local de prostaglandina, induz a secreção de metaloproteinases, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local. (LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO; WHITE, 1993; SANDROS *et al.*, 2000). 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).

Nosso laboratório 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.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004). Experimentos *in vitro* mostraram que esta citocina também é capaz de modular a função dos leucócitos polimorfonucleares (MEYLE, 1993).

Os metabólitos do ácido araquidônico também desempenham papel fundamental na doença periodontal. Eles são importantes mediadores catabólicos desta patologia, desde 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 cicloxigenase (COX) e lipoxigenase, e liberados em resposta à lesão tecidual local. Como exemplos destes metabólitos, podemos citar prostaglandinas (PG), prostaciclina (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 (VANE; BOTTING, 1998; ZHANG *et al.*, 2003; AZOUBEL *et al.*, 2007; AZOUBEL *et al.*, 2008). 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 capilar, bem como a reabsorção óssea pelos osteoclastos (ZHANG *et al.*, 2003).

A eficácia dos AINEs no tratamento da doença periodontal está associada à inibição dos metabólitos do ácido araquidônico (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Lohinai *et al.* (2001) 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 fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (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.

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-κB-IκB, ativando NF-κB, 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 JR *et al.*, 2007).

1.2.1 Doença periodontal e colágeno

O colágeno constitui a proteína estrutural básica de todos os tecidos periodontais, compreendendo cerca de 60% das proteínas da gengiva e do ligamento periodontal e mais de 90% da matriz orgânica do osso alveolar (GOLUB *et al.*, 1985).

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de endopeptidases que contêm zinco e estão envolvidas em vários eventos fisiológicos, tais como involução do útero após o parto, desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual, erupção dental, entre outros. Porém, as MMPs também participam de processos patológicos, entre os quais podemos citar artrite, aterosclerose, enfisema pulmonar, osteoporose e doença periodontal (RYAN; GOLUB, 2000).

Baixos níveis de MMPs estão presentes nos tecidos normais. Porém, em condições inflamatórias ou de dano tecidual, a expressão de MMP é aumentada pela ação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e TGF- β (fator transformador de crescimento- β), ou por mediadores celulares, como NO (McCARTHY *et al.*, 2008).

Estas enzimas promovem a degradação de macromoléculas que compõem a matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos. Elas são secretadas na forma latente e tornam-se ativas no meio pericelular através da clivagem da ligação Zn⁺²-cisteína. Esta ligação bloqueia a reatividade do sítio ativo da enzima (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

De acordo com Dahan *et al.* (2001), as MMPs são divididas em quatro grandes grupos dependendo do seu substrato e da homologia da sequência, a saber:

Grupo	Subgrupos
Colagenases	MMP-1 ou tipo fibroblasto MMP-8 ou tipo neutrofílico MMP-13 ou colagenase-3 MMP-18 ou colagenase-4
Gelatinases	Gelatinase-A ou MMP-2 Gelatinase-B ou MMP-9

Estromelisinina	Estromelisinina -1 ou MMP-3 Estromelisinina -2 ou MMP-10 Estromelisinina -3 ou MMP-11 Matrilisinina ou MMP-7
MT-MMPs (MMP tipo membrana)	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MT1-MMP

Quadro 1: Divisão das Metaloproteinases de Matriz (MMP)

Fonte: Dahan *et al.* (2001)

Metaloelastase (MMP-12), MMP-19 e MMP-20 (enamelisinina) também fazem parte da grande família das MMPs (DAHAN *et al.*, 2001).

As MMPs desempenham papel crítico na destruição dos tecidos de suporte da estrutura dentária. O início da destruição do colágeno na periodontite é causado pela ação das colagenases, um subgrupo das MMPs. Em condições saudáveis, o periodonto é protegido do ataque proteolítico mediado pelas MMPs pelos TIMPs (inibidores teciduais das metaloproteinases) (RAI *et al.*, 2008). De modo particular, TIMP-1 inibe de forma eficiente a atividade da colagenase. O inibidor forma complexos com a molécula da colagenase ativa, atuando como inibidor competitivo da enzima e, talvez, limitando o início da cascata colagenolítica (NAKAYA *et al.*, 2000). Na periodontite crônica, os níveis de TIMP estão baixos e insuficientes para inibir a grande quantidade de MMPs (RAI *et al.*, 2008).

A MMP-8 (colagenase do tipo neutrofílico ou colagenase-2) é o tipo predominante na periodontite. A principal origem desta colagenase é a partir de neutrófilos degranulados, os quais estão presentes na gengiva inflamada. Atualmente, sabe-se que a transcrição de MMP-8 também pode ocorrer através de células mesenquimais de linhagem não-neutrofílica, como, por exemplo, de fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva, indicando a habilidade destas células mesenquimais em produzir MMP-8 (MARCACCINI *et al.*, 2010; SORSA *et al.*, 2004). A MMP-8 possui a habilidade de quebrar o colágeno tipo I e III. Elevados níveis de MMP-8 estão altamente correlacionados com a profundidade de sondagem, perda clínica da fixação do dente e sangramento à sondagem (RAI *et al.*,

2008). Os níveis desta colagenase ficam reduzidos após terapia periodontal (KINANE *et al.*, 2003).

Além da MMP-8, também são encontrados outros tipos de metaloproteinases nos tecidos periodontais inflamados, tais como MMPs-1, -2, -3 e -9, ao passo que a gengiva sadia contém apenas a MMP-2. Essas MMPs degradam o colágeno tipo IV presente no tecido gengival (RAI *et al.*, 2008).

Tanto as células residentes da gengiva como os fibroblastos do ligamento periodontal produzem colagenases que estão envolvidas com a fisiologia tecidual. Colagenase tipo fibroblasto (MMP-1) e seu RNAm têm sido detectados no fluido e no tecido gengival, respectivamente, de pacientes com periodontite, contudo, é responsável, principalmente, pelo *turnover* tecidual normal e não pela degradação patológica (RYAN; GOLUB, 2000).

1.3 Estresse oxidativo

O oxigênio é necessário para a vida de todos os organismos vivos aeróbios. Contudo, ele pode ser extremamente tóxico, pois devido à sua natureza altamente reativa, pode fazer parte de moléculas nocivas denominadas radicais livres (PENDYALA *et al.*, 2010). Um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (LIMA; ABDALLA, 2001).

Em organismos aeróbios, os radicais livres são continuamente produzidos como produto do metabolismo normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FERREIRA *et al.*, 2007). O corpo humano contém uma série de mecanismos de defesa antioxidantes (enzimáticos e não-enzimáticos) capazes de remover os radicais livres logo após serem produzidos, a fim de prevenir seus efeitos deletérios (PANJAMURTHY *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007). Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GSHPx), ao passo que entre os antioxidantes não-enzimáticos podemos citar glutaciona reduzida (GSH) e vitamina C e E (PANJAMURTHY *et al.*, 2005).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é essencial para o bom funcionamento do organismo. As ROS em

baixas ou moderadas concentrações podem ser benéficas às células através de vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação. Porém, há situações, como em processos inflamatórios, em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes da célula encontra-se alterado em virtude da produção excessiva de ROS ou devido a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula. A este desequilíbrio denominamos estresse oxidativo (CANAKCI *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2007).

O excesso de ROS provoca dano tecidual através de diferentes mecanismos, tais como peroxidação lipídica, despolimerização de componentes da matriz extracelular, dano ao DNA e às proteínas, oxidação de importantes enzimas e estimulação da liberação de citocinas próinflamatórias (TSAI *et al.*, 2005; CANAKCI *et al.*, 2009; PENDYALA *et al.*, 2010).

Há também radicais livres que contêm nitrogênio os quais são denominados espécies reativas de nitrogênio (RNS). A principal RNS é o óxido nítrico (NO) (FERREIRA *et al.*, 2007). O óxido nítrico possui muitas funções biológicas importantes, como veremos adiante. Contudo, a produção excessiva de NO e espécies reativas nitrogênio (RNS), incluindo trióxido dinitrogênio (N_2O_3), dióxido de nitrogênio (NO_2) e peroxinitrito/ácido peroxinitroso ($ONOO^-/ONOOH$), causam danos a biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA, ocorrendo, assim, o estresse nitrosativo (KIKUGAWA *et al.*, 2004).

O NO e suas espécies reativas de nitrogênio (RNS) induzem o desacoplamento da respiração mitocondrial e facilita o estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS reagem com o NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) e outras RNS. O peroxinitrito é um potente oxidante, o qual promove a oxidação de espécies que exercem seus efeitos citotóxicos através da indução da despolarização da membrana mitocondrial e da ativação das caspases (LIU *et al.*, 2010).

A persistência da inflamação e a geração de ROS e RNS desenvolvem um papel central na injúria tecidual. Os estresses oxidativo e nitrosativo associados promovem diversas reações patológicas incluindo desordens neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, entre outras (ROBERTS *et al.*, 2009).

1.4 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 (IGNARRO *et al.*, 1987; MONCADA *et al.*, 1991; CLANCY *et al.*, 1998; MONCADA; HIGGS, 2006).

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 (DUSSE *et al.*, 2003; PANNU; SINGH, 2006).

1.4.1 Biossíntese do óxido nítrico

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) (MARLETTA, 1993; IANARO *et al.*, 1994; BRUNE *et al.*, 1998; VAN'T HOF; RALSTON, 2001; DUSSE *et al.*, 2003; KOLIOS *et al.*, 2004) e ocorre em duas etapas. Na primeira fase, ocorre a hidroxilação de um dos átomos de nitrogênio guanidinos da L-arginina a fim de gerar N^G-hidroxi-L-arginina (NHA) e, para tal utiliza-se NADPH e oxigênio (O₂). Na segunda fase, ocorre a conversão de NHA em NO e citrulina (MARLETTA, 1993; DUSSE *et al.*, 2003) (Figura 3).

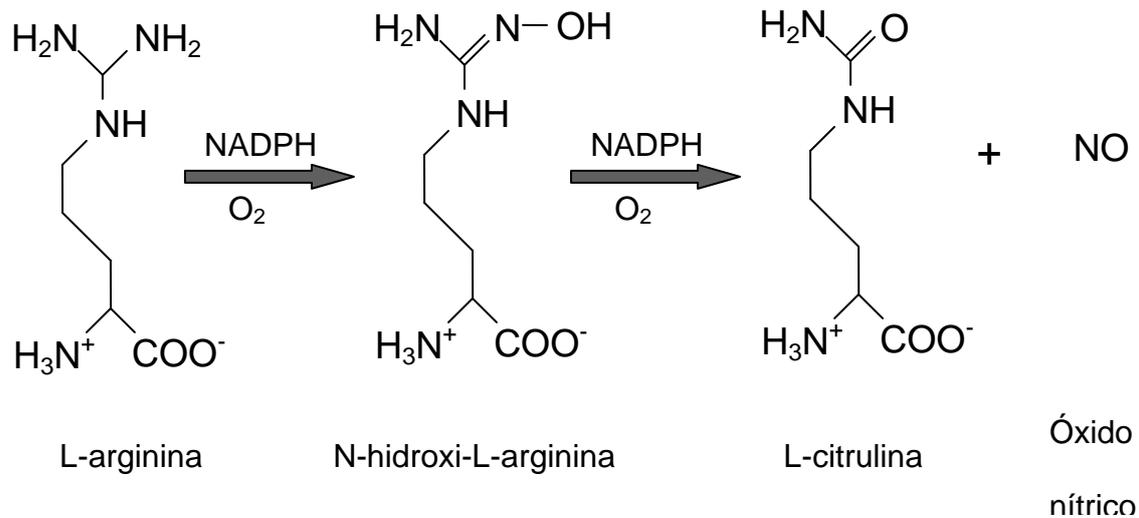


Figura 3: Etapas da síntese de NO e L-citrulina

Fonte: MARLETTA, 1993; DUSSE *et al.*, 2003.

Atualmente, foram identificadas três isoformas da enzima NOS. Duas destas isoformas apresentam-se constitutivamente no organismo, sendo denominadas NOS constitutiva (NOS_c) e foram inicialmente descritas no tecido neuronal (NOS_n) ou no endotélio vascular (NOS_e) (MONCADA, 1999; KOLIOS *et al.*, 2004; MONCADA; HIGGS, 2006). A produção de NO pelas NOS_c é baixa, na concentração de pico ou nanomolar, durante curto período de tempo (segundos a minutos). A ativação da enzima depende da interação com a calmodulina e dos níveis de Ca⁺² intracelular (CLANCY *et al.*, 1998; KRÖNCKE *et al.*, 1998; DUSSE *et al.*, 2003; KOLIOS *et al.*, 2004).

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 (NOS_i) (MONCADA *et al.*, 1999; KOLIOS *et al.*, 2004; MONCADA; HIGGS, 2006). A isoforma induzida é regulada principalmente a nível transcripcional (MONCADA *et al.*, 1991; GUZIK *et al.*, 2003). Em contraste com a forma constitutiva, a NOS_i funciona independente dos níveis de Ca⁺². Contudo, a calmodulina liga-se de maneira não-covalente a NOS_i e constitui uma subunidade essencial desta isoforma (MARLETTA, 1993; PANNU; SINGH, 2006). A síntese de NO pela NOS_i, mesmo sendo retardada por várias horas após o estímulo, ocorre em altas quantidades (micromolar) e continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores

necessários para a sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular (DUSSE *et al.*, 2003; KOLIOS *et al.*, 2004; PANNU; SINGH, 2006).

As grandes quantidades de NO proveniente da ativação da NOS_i possui efeito citotóxico e citostático, promovendo destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais (IANARO *et al.*, 1994; KOLIOS *et al.*, 2004; DUSSE *et al.*, 2003). A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (DUSSE *et al.*, 2003). Os mecanismos diretos de destruição pelo NO parecem envolver reações com metais, especialmente com grupos Fe-S, levando à inativação de enzimas mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons, inibição da replicação do DNA e indução de apoptose (IANARO *et al.*, 1994). O NO também age de forma indireta, através de sua reação com radicais superóxidos, a fim de formar moléculas altamente reativas, tais como peroxinitrito (ONOO⁻) e radical hidroxil (VAN'T HOF; RALSTON, 2001; DUSSE *et al.*, 2003; MONCADA; HIGGS, 2006; PANNU; SINGH, 2006). A produção dessas moléculas contribui para o dano tecidual característico da resposta inflamatória (MONCADA; HIGGS, 2006; VAN'T HOF; RALSTON, 2001; SALVEMINI *et al.*, 1996).

Todas as três isoformas da NOS são homodiméricas e dependem do substrato L-arginina bem como de cofatores/coenzimas, a saber: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), oxigênio (O₂) e protoporfirina IX (MARLETTA, 1993; PANNU; SINGH, 2006). A NOS_c e a NOS_i diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (DUSSE *et al.*, 2003) (Figura 4).

Há outras formas de síntese de NO independente da ação da NOS, através de reações específicas como a liberação de NO através do H₂O₂ e L-arginina por via não enzimática, ou pela redução de nitritos ou outras reações de redução, como ocorre em processos de isquemia (DIAS *et al.*, 2006).

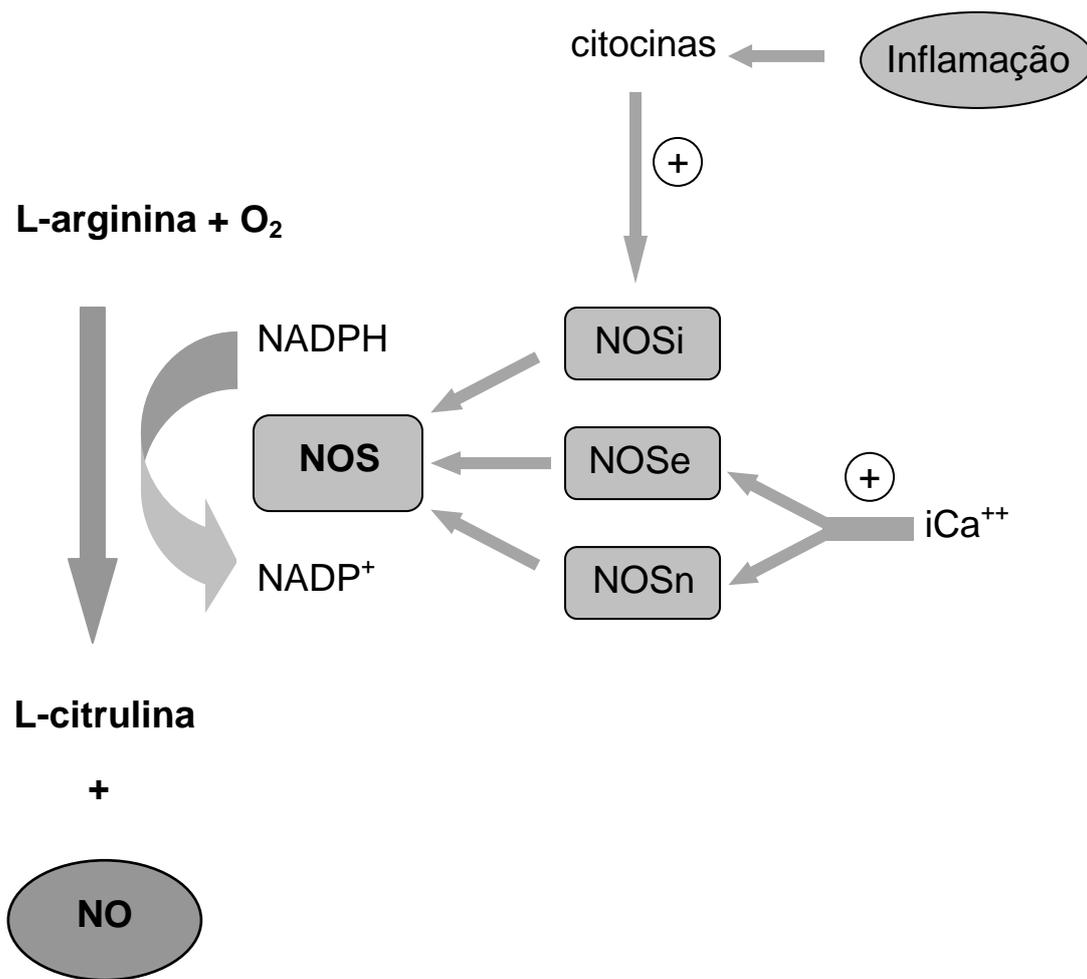


Figura 4: A via L-arginina-óxido nítrico

O NO é sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular por meio da ação da enzima NOS. Durante a inflamação, citocinas, tais como IL-1 e TNF, estimulam a expressão de NOSi. A ativação das NOS constitutivas dependem da interação com a calmodulina e dos níveis de cálcio intracelular
 Fonte: VAN'T HOF; RALSTON, 2001.

1.4.2. Ações do óxido nítrico

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, neurotransmissão, entre outros (MONCADA, 1999; SHISHIDO *et al.*, 2003; PACHER *et al.*, 2007).

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). (KOKKOLA *et al.*,

2005; MONCADA; HIGGS, 2006; DIAS *et al.*, 2006). O NO reage com o íon ferro localizado no centro do grupamento heme da GCs ocasionando mudança conformacional e ativando a catalização da guanosina-5'-trifosfato (GTP) em GMPc (DIAS *et al.*, 2006). O GMPc possui significante efeitos regulatórios e anti-inflamatórios (KOLIOS *et al.*, 2004). Contudo, há evidências de que o NO também pode atuar através de mecanismos independente de GMPc (KOKKOLA *et al.*, 2005).

No sistema vascular, a ativação da NOS, a síntese do NO e o subsequente aumento da concentração de GMPc promove vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, além de interferir na interação entre a parede do vaso e os leucócitos (GUZIK *et al.*, 2003; MONCADA; HIGGS, 2006; DERAKHSHAN *et al.*, 2007).

O NO é capaz de regular vários eventos envolvidos na cicatrização cutânea, tais como deposição de colágeno, angiogênese, proliferação celular e apoptose (RIZK *et al.*, 2004). Camundongos com ausência do gene para eNOS apresentaram um retardo no fechamento da ferida, como também um prejuízo no crescimento de capilares *in vitro* (LEE *et al.*, 1999). Além disso, o bloqueio farmacológico da NOS prejudicou a cicatrização de feridas cutâneas em modelos animais (SCHAFFER *et al.*, 1996, SCHAFFER *et al.*, 1999), porém o uso de doadores de NO acelerou a cicatrização de feridas em ratos (AMADEU *et al.*, 2007; AMADEU *et al.*, 2008).

Contudo, o efeito do NO na cicatrização é altamente dependente de sua concentração. Em baixas doses, o NO aumenta a síntese de colágeno promovendo a reparação da ferida (SHI *et al.*, 2001). Diferentemente, o NO em altas concentrações aumenta a formação de coágulo e tecido reacional, bem como prejudica a organização do colágeno, contribuindo para a toxicidade celular e retardo na cicatrização (BAUER *et al.*, 1998).

O NO também possui efeito antioxidativo induzindo a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo a quantidade de íon superóxido (O_2^-) disponível e, conseqüentemente, a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$). O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons livres e previne a geração de superóxido (O_2^-) (DUSSE *et al.*, 2003).

Outrossim, o NO atua como um neuromodulador, sendo identificado como o mediador inibitório da transmissão não-adrenérgica não-colinérgica nos nervos periféricos (GUZIK *et al.*, 2003; MONCADA; HIGGS, 2006). Devido às suas características e alta difusibilidade, o NO é capaz de penetrar no citoplasma celular

diretamente, sem necessidade de receptores de membrana, levando a respostas rápidas e precisas (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Esta neurotransmissão nitrérgica é responsável pelo relaxamento do fundo gástrico, da traquéia, da bexiga, bem como dos corpos cavernosos, resultando na ereção peniana (GUZIK *et al.*, 2003; MONCADA; HIGGS, 2006).

O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, possuindo ação antibactericida, antiparasitária e antiviral. Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microrganismos invasores. Existe um ténue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade necessária às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação microbicida (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Contudo, o NO também pode ser um mediador 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 (SHISHIDO *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2004; LEITÃO *et al.*, 2005).

Os efeitos biológicos do NO dependem de seu sítio de ação, de sua fonte de produção e de sua concentração (SHISHIDO *et al.*, 2003). Altas concentrações de NO produzem efeitos prejudiciais ao próprio hospedeiro, tais como dano ao DNA e às proteínas, estimulação da liberação de citocinas inflamatórias (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000), aumento da formação de coágulos e da reação tecidual, prejuízo na organização do colágeno, contribuindo para a toxicidade celular e retardando a cicatrização (BAUER *et al.*, 1998).

O 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 (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000; BATISTA *et al.*, 2002; UĞAR-ÇANKAL *et al.*, 2006).

Em nosso laboratório, foi demonstrada uma participação do NO nos eventos inflamatórios e na perda óssea da doença periodontal experimental (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.

1.4.3 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 (VAN'T HOF; RALSTON, 2001; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; TAT *et al.*, 2009).

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 (VAN'T HOF; RALSTON, 2001; LINS *et al.*, 2007; TAT *et al.*, 2009). Os osteoclastos possuem morfologia e características próprias, como a formação de uma borda pregueada adjacente à matriz calcificada em reabsorção (TAT *et al.*, 2009).

Os osteoblastos 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 velho 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 (VAN'T HOF; RALSTON, 2001; TAT *et al.*, 2009).

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) tem sido 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 na superfície de 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 osteoclastos, atua como receptor solúvel para RANKL e exerce um efeito inibitório no processo de diferenciação dos pré-osteoclastos. 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 (BOYLE *et al.*, 2003; TAT *et al.*, 2009).

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 subsequente pelo aumento da expressão de RANKL enquanto há uma diminuição da produção de OPG nos osteoblastos/estroma celular. Em contraste, mediadores anti-inflamatórios, 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 pode atuar nos próprios osteoblastos ou osteoclastos

durante a remodelação óssea, sendo o NO um regulador autócrino ou parácrino do metabolismo ósseo (KENDALL *et al.*, 2001).

Contudo, o papel do NO na reabsorção óssea é controverso. Estudos mostram que o NO inibe a reabsorção óssea através da estimulação da apoptose das células precursoras de osteoclastos, pelo aumento da função dos osteoblastos, bem como pela inibição do recrutamento, da proliferação e da ativação dos osteoclastos (MACINTYRE *et al.*, 1991; VAN'T HOF; RALSTON, 2001; FAN *et al.*, 2004). Além disso, Fan *et al.* (2004) 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* (BUTTERY *et al.*, 1999; MANCINI *et al.*, 2000).

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 *et al.*, 1994), o qual deve ser, pelo menos parcialmente, em virtude do efeito pró-apoptótico do NO sobre os osteoblastos (DAMOULIS *et al.*, 1997).

De acordo com Van't Hof e Ralston (1997), altas concentrações de NO exógeno inibe 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 NOSi 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).

Os marcadores bioquímicos de remodelação óssea são importantes para avaliar o dinamismo do tecido ósseo e são, atualmente, considerados indispensáveis nas avaliações de efetividade de novas drogas para o tratamento de patologias ósseas, além de trazerem grandes contribuições científicas sobre a fisiologia e a fisiopatologia do osso (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A fosfatase alcalina contida no plasma é o somatório de várias isoenzimas provenientes do osso, do fígado, do intestino e, durante a gravidez, da placenta. A fosfatase alcalina óssea é um marcador da atividade osteoblástica e o surgimento desta enzima coincide com a formação óssea (MATOS; SANT'ANA, 1996). Esta enzima está presente no ligamento periodontal e encontra-se alterada na periodontite (GILBERT *et al.*, 2003). Assim, a dosagem de fosfatase alcalina óssea pode ser utilizada como um marcador da atividade da doença ou como parâmetro de resposta ao tratamento instituído (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

1.5 S-Nitrosotiol e S-Nitrosoglutationa

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).

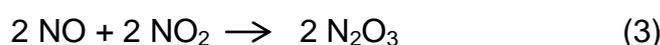
Os S-nitrosotióis (RSNO) contêm uma ligação química simples entre um grupo tiol (sulfidril) e a molécula de NO (MILLER; MEGSON, 2007). Eles são doadores de NO e atuam também como reservatórios e transportadores de NO *in vivo*, devido a sua grande estabilidade em comparação ao NO livre (BUTLER; RHODES,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

A maioria dos S-nitrosotióis (RSNO) são sintetizados a partir da reação entre um tiol e um nitrito acidificado (equação 1, onde RSH representa um tiol e RSNO um nitrosotiol) (HOGG, 2000).



Em condições anaeróbicas, o NO não reage diretamente com os tióis para formar RSNO, mas deve primeiramente ser oxidado, formando NO₂ e N₂O₃ (PERCIVAL *et al.*, 1999).

Os RSNO também podem ser formados através da reação do NO com um tiol através da nitroação do trióxido dinitrogênio (N₂O₃) (KLOEK *et al.*, 2002; JOURD'HEUIL *et al.*, 2003). O N₂O₃ pode ser formado a partir da reação entre óxido nítrico e oxigênio. Esse mecanismo é responsável pela formação de RSNO a partir do óxido nítrico e tióis em soluções oxigenadas (equações 2, 3 e 4) (HOGG, 2000).



Outros mecanismos foram propostos para a formação dos RSNO, tais como: reação de tióis com complexos nitrosilheme ou ferro-dinitrosil, reação direta de tióis com NO na presença de um elétron acceptor como NAD⁺, nitroação catalisada pelo cobre e reações de tióis com peroxinitrito (JOURD'HEUIL *et al.*, 2003).

Muitas funções biológicas dos S-nitrosotióis foram descritas como sendo em virtude da: (1) liberação de NO; (2) transnitroação; (3) S-tiologia; e (4) ação direta. Isto ressalta o fato de que os S-nitrosotióis são mais do que simples doadores de NO (HOGG, 2000).

A transnitroação pode ser definida como a transferência de um grupo nitroso funcional de um nitrosotiol a um tiol como mostrado na equação 5. Isso 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 (HOGG, 2000).



A reação de S-tiologia do RSNO envolve o ataque nucleofílico do enxofre do RSNO por um ânion tiolato, dando um dissulfito e ânion nitroxil como produtos (equação 6) (HOGG, 2000).



Os RSNOs também podem agir de forma direta. Têm sido sugerido que o SNAP (S-nitroso-N-acetil-penicilamina) pode estimular a guanilato ciclase diretamente através da interação com o grupamento heme da enzima. Além disso, o S-nitrosoglutaciona (GSNO) também pode atuar como substrato/inibidor de várias

enzimas que utilizam a glutathione (GSH), como γ -glutamyltranspeptidase (HOGG, 2000).

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 transnitrosação 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 nitrosação das proteínas celulares (ACHUTH *et al.*, 2005).

O efeito protetor dos S-nitrosotióis contra a injúria por reperfusão tem sido descrito na literatura e parece requerer a formação de NO. O mecanismo pelo qual esse efeito ocorre ainda não está totalmente estabelecido, mas acredita-se que o RSNO deve suprimir a agregação plaquetária e inibir a infiltração dos leucócitos, bem como atuar como antioxidante contra a oxidação mediada por radicais livres (HOGG, 2000).

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 no local, 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, onde foram usados vários tipos de RSNOs. Esses estudos enfatizam que a ação promovida pelo RSNO pode ocorrer devido seu efeito extracelular direto.

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 glutathiona (GSH) são encontrados endogenamente em tecidos e plasma de mamíferos. A glutathiona, a não-proteína tiol mais abundante *in vivo* (AL-SA'DONI; FERRO, 2000; HOGG, 2000), é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (VENKETARAMAN *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007). 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, a GSH é convertida à sua forma oxidada, a glutathiona dissulfeto (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). Outrossim, a glutathiona também funciona como molécula transportadora de NO, na forma de S-nitrosoglutationa (VENKETARAMAN *et al.*, 2003).

O S-nitrosoglutationa (GSNO) é um dos mais importantes RSNOs encontrado *in vivo* (AMADEU *et al.*, 2007) e é formado pela reação da GSH com NO/O₂ (KIKUGAWA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007). Contudo, de acordo com Singh *et al.* (1996a), 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.

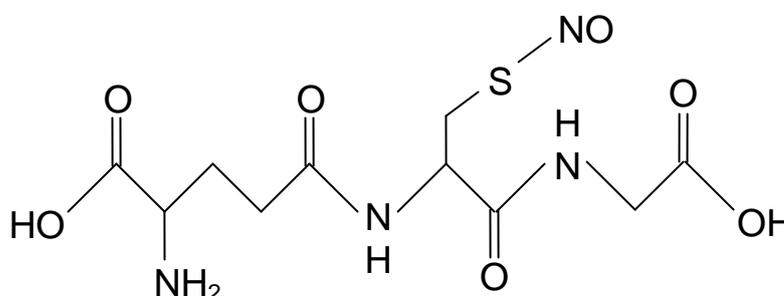


Figura 5: S-nitrosoglutationa

O S-nitrosoglutathione é um metabólito fisiológico da glutathione (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).

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).

Outrossim, 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 (LANGFORD *et al.*, 1994), na pré-eclampsia (BELDER *et al.*, 1995) e no tratamento do infarto agudo do miocárdio e da angina instável (LANGFORD *et al.*, 1996). 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, demonstrou-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 (AMADEU *et al.*, 2007; AMADEU *et al.*, 2008). Achuth *et al.* (2005) demonstrou que o GSNO administrado intraperitonealmente intensificou a deposição de colágeno em lesões, contudo não interferiu na atividade das metaloproteinases de matriz (MMP).

Amadeu *et al.* (2007) mostraram que o GSNO foi capaz de aumentar a quantidade de mastócitos sem alterar sua função durante a cicatrização.

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 (JOHN *et al.*, 2001; VENKETARAMAN *et al.*, 2005; ZAMAN *et al.*, 2006). 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, os quais podem reagir com o superóxido produzido pelas bactérias durante o metabolismo aeróbico formando peroxinitrito (OONO⁻).

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). O GSNO pode ser incorporado em filmes sólidos não-tóxicos de polivinil álcool (PVA) e polivinil pirrolidona (PVP). O PVP constitui um dos polímeros mais utilizados na área médica, devido a sua solubilidade em água e sua citotoxicidade extremamente baixa (SEABRA *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A periodontite permanece como uma importante causa de perda dentária em adultos e é um fator de risco significativo para diversas doenças (PIHLSTROM *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2006). Ela tem sido tradicionalmente tratada por procedimentos mecânicos, a fim de descontaminar a superfície radicular (GOLUB *et al.*, 1998; SALLUM *et al.*, 2002). No entanto, esta abordagem pode provocar prejuízos ao cimento e à dentina, consistindo em perda de substância dental e recessão gengival. Além disso, a terapia mecânica pode não eliminar por completo os patógenos periodontais, pois os mesmos podem estar em áreas inacessíveis à esta abordagem (GRISI; GRISI, 1999).

As medicações sistêmicas podem ser usadas como coadjuvantes na terapia periodontal. Os fármacos usados sistemicamente podem ser divididos em dois grandes grupos: o primeiro, contendo medicamentos que atuam nos patógenos periodontais e; o segundo, com medicações capazes de modular a resposta do hospedeiro (CIANCIO, 2002).

Em nosso laboratório, Leitão *et al.* (2004) mostraram que um doador de óxido nítrico (isosorbida) reduziu a perda óssea alveolar, a reabsorção do cimento e o infiltrado celular inflamatório na doença periodontal experimental, sugerindo que este doador de NO tem efeito protetor sobre as estruturas periodontais. Contudo, os mecanismos como este doador de NO atuava neste modelo não foi estudado.

O S-nitrosoglutathiona (GSNO) é um metabólito fisiológico da glutathiona (GSH) e do NO e está envolvido em várias atividades farmacológicas e de sinalização (KHAN *et al.*, 2005). O GSNO é um composto estável, é doador endógeno de NO e atua produzindo efeitos biológicos semelhantes a este radical livre, protegendo, também, contra o estresse oxidativo (PANNU; SINGH, 2006).

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel do S-nitrosoglutathiona (GSNO) na doença periodontal experimental (DPE) em ratas, visto não ter sido previamente descrito na literatura, até o presente momento, um estudo definitivo sobre o papel do GSNO no desenvolvimento da doença periodontal.

Ademais, o presente trabalho objetivou ainda investigar o efeito do GSNO em modelos de inflamação aguda (edema de pata e peritonite), a fim confirmar os dados obtidos na DPE, a qual é considerada um modelo de inflamação crônica.

Como objetivos específicos, o presente trabalho buscou:

- Avaliar o efeito do GSNO em relação à perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal experimental;
- Avaliar o efeito do GSNO sobre a inflamação que ocorre na doença periodontal experimental, na peritonite e no edema de pata através da análise de diversos parâmetros inflamatórios;
- Avaliar o efeito do GSNO sobre o estresse oxidativo na doença periodontal experimental, na peritonite e no edema de pata.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidas 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. Todos receberam água e alimentação *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

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 53/08.

3.2 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

Durante o curso dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Balança digital eletrônica para pesagem de animais – Filizola;
- Balança analítica Ohaus AS600;
- Balança analítica Marte AL200;
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²);
- Centrífuga para Eppendorf Centrifuge 5804R;
- Citocentrífuga Cito-Ciclo Revan;
- Eppendorfs;
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys;
- Fio de náilon para sutura 3.0;
- Geladeira e freezer (-70°C);
- Homogeinizador de tecidos Politron PT 3100;
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.);
- Leitora de ELISA Biotec ELx 800;

- Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7,2 mpx);
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N;
- Milli-Q Millipore;
- Microscópio Leica acoplado a computador;
- Microscópio óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2;
- Micrótopo Olympus;
- Placas para leitora de ELISA – 96 poços;
- Pletismômetro Ugo-Basile 7140;
- Pipetas Gilson automáticas de 1000, 200, 20, 10, 5, 1 μ L;
- Pipeta multicanal – 12 poços;
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma;
- Seringas (B-D Plastipak);
- Tubos de polipropileno para centrífuga (15 e 50 mL);
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- Vortex Maxi Mix II Thermolyne tipe 37600 mixer.

3.3 Fármacos, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes Utilizados

- Acetona (Sigma)
- Ácido Nítrico 7% (Dinâmica);
- Ácido Tricloacético (TCA) 100% (VETEC);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Anticorpo primário de coelho anti-NOSi (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo primário para metaloproteinase-1/8 (Santa Cruz Biothechnology);
- Anticorpo policlonal primário de coelho para fração p50 NLS de NF- κ B (Santa Cruz Biothechnology)
- Anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biothechnology);
- Azul de metileno 1% (Sigma);
- Carragenina (Sigma);
- Corante rápido HEMA 3 (Newprov);
- DTNB 0,01 M (Fluka)

DTNB ----- 13,2 mg.

Metanol ----- 3,33 mL.

- Eosina (Merck);
- EDTA 0,2 M e 0,02 M (Cromato);
- Éter etílico P.A. (Dinâmica);
- Formol 10% (Reagen);
- Glutationa (Sigma Aldrich);
- Hematoxilina (Reagen);
- Heparina (Cristália);
- Hidrato de cloral 10% (Reagen);
- Kit DuoSet (R&D Systems) – para dosagem das citocinas IL-1 e TNF- α ;
- Kit para dosagem de fosfatase alcalina (Labtest);
- Líquido de Turk (diluidor para contagem total de células):
 - Ácido acético glacial P.A. (Merk).....20 mL
 - Violeta de genciana.....2 mL
 - Água destilada.....1000 mL
- NEED (Sigma);
- Nitrato redutase (Sigma);
- Nitrito de sódio P.A. (Vetex);
- Nitrito de sódio (Sigma Aldrich);
- Peróxido de hidrogênio 0,1% (Vetec)
- Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma Aldrich);
- Solução salina;
- Solução de o-dianisidina (DDI)
 - O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg.
 - Tampão fosfato de potássio -----10 mL.
 - H₂O₂ -----50 μ L.
 - Água destilada ----- 90 mL.
- Solução para pletismômetro
 - Cloreto de sódio (Vetec)-----45 mg
 - Solução padrão ----- 0,3 mL
 - Água destilada ----- 100 mL
- Sulfanilamida (Sigma);

- Sulfato de sódio 5% (VETEC);
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
 - HTAB (Sigma) ----- 5 g.
 - Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.
- Tampão fosfato de potássio (Dinâmica);
- Tris 0,4 M pH 8,9
 - Tris ----- 4,84 g.
 - EDTA 0,2 M ----- 10 mL.
 - Água destilada ----- 100 mL.
- Tricrômio de Mallory (Dinâmica)

3.3.1 Síntese de S-nitroso-glutationa (GSNO)

A GSNO foi 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, 2006). A glutatona foi dissolvida em solução de ácido clorídrico e o nitrito de sódio foi adicionado à solução, que permaneceu 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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 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).

Foi utilizada uma solução PVP (polivinil pirrolidona) como veículo para a liberação do GSNO nos modelos estudados. Foram realizadas dissoluções prévias de GSNO e PVP separadamente em solução salina 0,9%, a fim de realizar, em seguida, a mistura das soluções supracitadas. As soluções PVP/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 PVP obtida a partir de 2 g do pó do polímero com 2 mL de solução salina (10%w/w), resultando nas soluções PVP/GSNO contendo GSNO nas concentrações 0,5, 2 e 10 mmol L^{-1} com concentração final de PVP a 8%w/w. A solução de PVP a 8%w/w sem GSNO foi usada como controle.

3.4 Indução da Doença Periodontal Experimental

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% (400 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). A Doença Periodontal Experimental (DPE) foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de sutura de náilon (3.0) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia nos espaços interproximais mesial e distal do dente supracitado, a fim de facilitar a colocação do fio. Este foi adaptado de modo que o nó cirúrgico fique voltado para a face vestibular da boca do animal. Após 11 dias, sacrificou-se o animal através de deslocamento cervical, sendo tal procedimento precedido por anestesia em câmara de éter.

O dia escolhido para o sacrifício foi o 11º dia de experimento, o qual foi baseado em estudos prévios realizados no LAFICA, que constataram destruição total do processo alveolar e destruição importante do cimento (LIMA *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005).

3.5 Grupos Experimentais

3.5.1 Grupo *naive*

Esse grupo foi constituído por animais que não foram submetidos a nenhum estímulo ou procedimento inflamatório, nem foi administrada nenhuma solução, a fim de verificar a existência de alguma alteração nos parâmetros analisados entre os grupos.

3.5.2 Grupo tratado com Salina

Nos experimentos de indução da DPE, esse grupo foi constituído por animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE), os quais receberam injeções de 50 µL de solução salina a 0,9% na gengiva ao nível do segundo molar superior esquerdo 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia de indução da DPE até o 11º dia.

3.5.3 Grupo tratado com PVP

Nos experimentos de indução da DPE, esse grupo foi constituído por animais com DPE que receberam apenas PVP (50 μL) na gengiva do segundo molar superior esquerdo 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia até o 11^o dia, quando ocorreu o sacrifício.

3.5.4 Grupos tratados com GSNO

Esses grupos foram constituídos por animais que receberam 50 μL de GSNO nas concentrações de 0,5, 2 ou 10 mmol L^{-1} , de acordo com o grupo ao qual cada animal pertencia. Com isso, cada animal recebeu as doses de 25, 100 ou 500 nmol, respectivamente.

Essas doses foram administradas subgengivalmente a nível do segundo molar superior esquerdo 30 minutos antes e diariamente após a indução da DPE, sendo sacrificados no 11^o dia.

3.6 Parâmetros Avaliados

3.6.1 Análise do Índice de Perda Óssea Alveolar

Os animais foram sacrificados no 11^o dia após o procedimento cirúrgico. 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 calculou a área correspondente aos dentes e à perda óssea alveolar das hemiarcadas com DPE, da qual foi 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 foram posteriormente convertidos em mm^2 pelo uso de um padrão de milímetros fixado ao lado das maxilas.

3.6.2 Dosagem sérica da variação da fosfatase alcalina óssea

Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de ratas anestesiadas antes da indução da periodontite e no 11^o dia (dia do sacrifício). O sangue foi centrifugado (1800 g x 10 min) e o sobrenadante foi armazenado a – 70 °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 seguida foi conforme 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 °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 °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).

3.6.3 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 tratamento com EDTA a 10% por aproximadamente 5 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 5 µm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelos métodos HE e Tricrômio de Mallory.

Para a análise microscópica da hemiarcada com a coloração HE, foi considerada a região entre os 1^o e 2^o molares, sendo avaliados os aspectos

inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento. 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:

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

Quadro 2: Escores histopatológicos considerando o infiltrado celular inflamatório e a integridade do cimento e osso alveolar

Fonte: LEITÃO *et al.*, 2005

Para análise microscópica da hemiarcada pela coloração Tricrômio de Mallory, também foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliados os feixes de fibras colágenas de forma qualitativa, isto é, sua direção, continuidade e densidade.

3.6.4 Dosagem de mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada, portanto, como marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, cuja presença foi determinada pelo método colorimétrico ELISA. As medidas de atividade da MPO

foram realizadas a partir da gengiva da região de molares superiores das ratas, usando uma versão modificada do método descrito por Bradley e colaboradores (BRADLEY *et al.*, 1982). Na 6ª hora, os animais foram sacrificados e suas gengivas foram removidas, pesadas e congeladas em freezer -70°C até a realização do ensaio. Durante a determinação, as amostras foram incubadas em solução de HTAB 0,5% (brometo de hexadecilmetilamônio) na proporção de 15 mg de tecido por 400 µL de tampão. Em seguida foram homogeneizadas e centrifugadas (1500g/15min/4°C), sob condições adequadas de refrigeração. Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs e novamente centrifugados (10 min) para a melhor remoção dos contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante em placas de 96 poços, em duplicata, 200µL da solução de leitura (5 mg de O-dianisidine, 15µL H₂O₂ 1%, 3 mL de tampão fosfato de potássio, 27 mL de água destilada) foram adicionados aos poços e foi realizada a leitura a 460 nM (t₀=0 min e t₁=1min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como Unidades de MPO/mg de tecido.

3.6.5 Dosagem de citocinas

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. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão para citocinas como descrito por Safieh-Garabedian *et al.*, 1995. A detecção das citocinas IL-1β e TNF-α foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4°C com 100µL por poço de anticorpo de captura para IL-1 e TNF-α. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300µL de tampão de lavagem e bloqueadas com 100µL por poço BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100µL 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 300µL 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 300µL de tampão de lavagem e incubadas a

temperatura ambiente por 20 minutos com 100 µL de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300µL de tampão de lavagem e 100 µL 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. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.6.6 Imunohistoquímica para detecção da enzima oxido nítrico sintase induzida (NOSi), para metaloproteinase-1/-8 e para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear-κB (NF-κB)

A imunohistoquímica para NOSi, MMP-1/-8 e NF-κB foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 11^o dia, os animais foram sacrificados e tiveram 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 4µm 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 forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. 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% (15 minutos). Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-NOSi diluído 1:200, com anticorpo policlonal primário de coelho para MMP-1/-8 (H-300) diluído em 1:200 ou com anticorpo policlonal primário de coelho para a fração p50 NLS de NF-κB diluído em 1:200 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, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC

Vectastain®) 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, realizou-se 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%.

3.6.7 Dosagem de nitrito/nitrato

No 11º dia, os animais foram sacrificados e suas mucosas, após serem removidas e congeladas em *freezer* a 70°C negativos até a realização do ensaio. A dosagem de nitrito 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 foi homogeneizadas em 100µL 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) foi preparada. 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 NO_x (µM).

3.6.8 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 300µL 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.

3.6.9 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

A concentração de malondialdeído nos tecidos é utilizada como indicador da peroxidação lipídica (ANTUNES *et al.*, 2008). Os níveis de malondilaldeído 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 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador vortex, centrifugados a 1200 xg por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de fragmentos umedecidos.

3.7 Edema de Pata Induzido por Carragenina

O volume da pata traseira esquerda de cada rata foi aferido usando pletismômetro (UGO BASILE) antes da injeção do estímulo inflamatório carragenina (tempo zero), constituindo volume basal das patas. Em seguida, foi administrado 1 mL de salina, PVP ou GSNO nas concentrações 0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹ por via intraperitoneal. Com isso, cada animal recebeu GSNO nas doses de 0,5, 2 ou 10

μmol , respectivamente. Após uma hora, foi injetada na pata supracitada 0,1 mL de carragenina (500 μg /pata) por via subplantar (sp).

O volume da pata foi aferido 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo inflamatório. Para cada tempo, o volume do edema foi calculado como variação do volume da pata (volume no tempo determinado – volume no tempo zero). Após a avaliação do edema, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi feita a coleta de pele e tecido celular subcutâneo da região subplantar para análise.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: grupo naive (sem nenhum estímulo inflamatório, que recebeu apenas salina tanto na pata como intraperitonealmente) e os grupos que receberam o estímulo inflamatório carragenina na pata: salina, PVP, GSNO 0,5, 2 ou 10 mmol L^{-1} . Foram analisados os seguintes parâmetros: volume do edema da pata, atividade de MPO, produção das citocinas IL-1 β e TNF- α , concentração de nitrito/nitrato (NOx), glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA), os quais foram realizados como descrito anteriormente.

3.8 Peritonite Induzida por Carragenina

Os animais foram pré-tratados com 1 mL de salina, PVP ou GSNO nas concentrações de 0,5, 2 ou 10 mmol L^{-1} (doses de 0,5, 2 ou 10 μmol , respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes da injeção de 1 mL do estímulo inflamatório Carragenina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, i.p.). Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Em seguida, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de solução de PBS heparinizado. Os abdomens dos animais foram massageados, expostos e foram coletados cerca de 6 mL de fluido de lavagem com pipeta Pasteur a fim de avaliar a migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, para a cavidade peritoneal e para análise de outros parâmetros inflamatórios.

Do exsudato colhido, 20 μL foram diluídos em 380 μL de líquido de Turk (diluição 1:20) e utilizados para contagem total de células em câmara de Neubauer.

Para contagem diferencial das células, foram utilizados 30 μL do exsudato na preparação dos esfregaços, em citocentrífuga, a 2800 r.p.m., durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA 3. A leitura foi

realizada em microscópio óptico através de objetiva de imersão em óleo (aumento 100x), onde foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-se em polimorfonucleares e mononucleares. O número de neutrófilos foi estimado multiplicando-se o percentual encontrado destas células (contagem diferencial) pelo número total de leucócitos (contagem total), dividido por 100.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: naive (sem estímulo inflamatório e recebeu apenas salina intraperitonealmente), e os grupos que receberam carragenina: salina, PVP, GSNO nas concentrações de 0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹. Foram analisados os seguintes parâmetros: migração de leucócitos e polimorfonucleares, atividade de MPO, produção das citocinas IL-1 β e TNF- α , concentração de nitrito/nitrato (NO_x), glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA), conforme descrito anteriormente.

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

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

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a perda óssea alveolar na DPE em ratas

4.1.1 Estudo do Índice de Perda Óssea

A indução da DPE nos animais que receberam apenas salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ resultou em reabsorção óssea significativa em relação aos animais sem DPE, cujo IPO foi zero. Observou-se que o GSNO tanto na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ como na de 2 mmol L⁻¹ foi capaz de inibir, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o IPO, representado pela redução na reabsorção óssea na face vestibular das maxilas em 56,73% e 83,00%, respectivamente, quando comparado ao grupo salina, e em 56,80% e 83,03%, respectivamente, em relação ao grupo PVP (Figura 6).

4.1.2 Aspecto macroscópico da hemiarcada superior esquerda de animais sem e com doença periodontal experimental (DPE)

Observou-se a partir da avaliação macroscópica da hemiarcada superior esquerda de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE) e que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (Figuras 7B, 7C e 7F, respectivamente), que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal experimentalmente, de forma a reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, tais como: reabsorção óssea alveolar e exposição de raízes, quando comparado aos animais normais, sem DPE (Figura 7A). Observou-se redução da perda óssea nos grupos de animais submetidos à DPE e tratados com GSNO 0,5 mmol L⁻¹ (Figura 7D) ou GSNO 2 mmol L⁻¹ (Figura 7E) em relação aos grupos de animais com DPE que receberam apenas salina ou PVP.

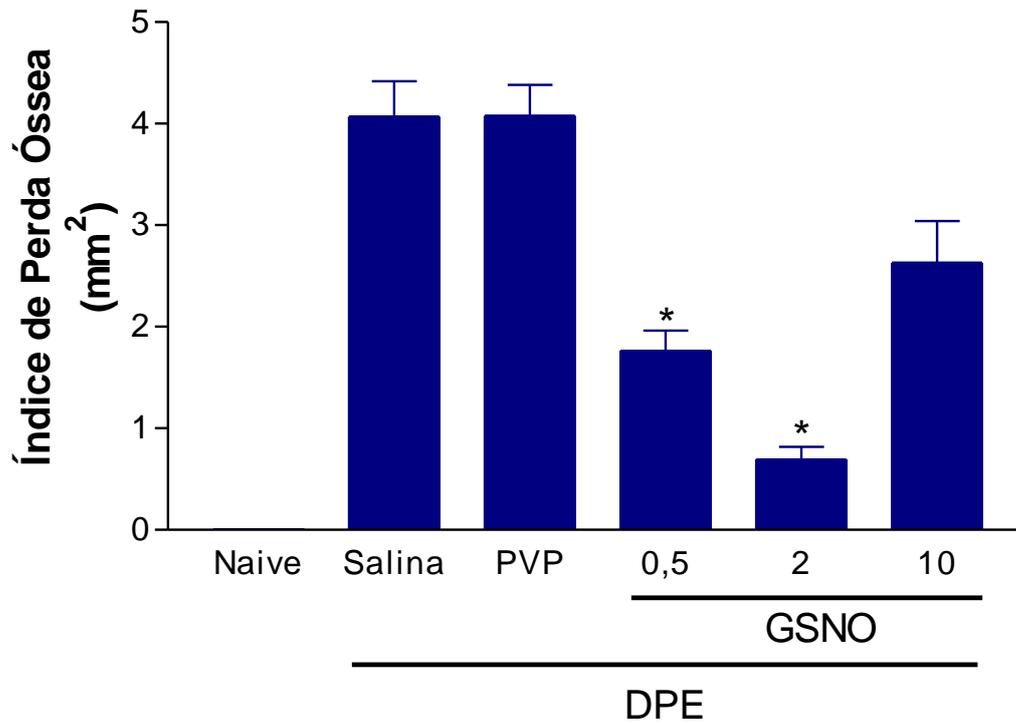
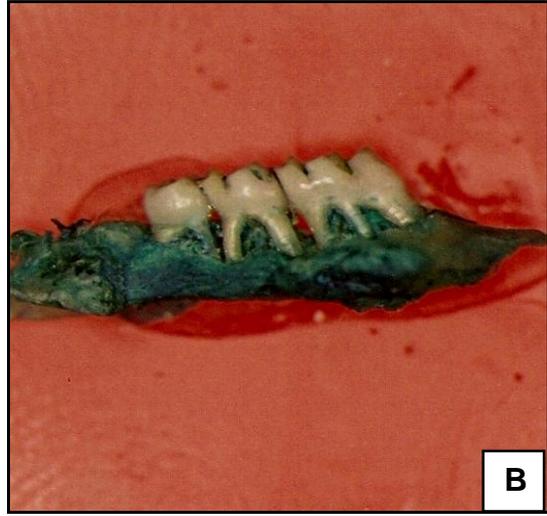


Figura 6: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) na doença periodontal experimental (DPE) em ratas.

GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹), PVP ou salina foram administrados subgingivalmente 30 minutos antes e diariamente após a indução da DPE. A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais foram sacrificados 11 dias após o procedimento cirúrgico. Observou-se que o GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ reduziram significativamente o IPO. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação aos animais com DPE que receberam apenas salina ou PVP (ANOVA, Bonferroni)



Naive



DPE



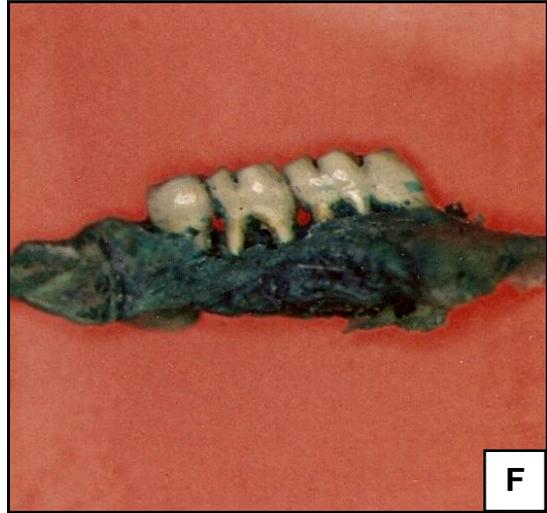
PVP



GSNO 0,5



GSNO 2



GSNO 10

Figura 7: Aspecto macroscópico de maxilas de ratas normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com salina, PVP ou GSNO.

Os animais foram submetidos à indução da DPE e receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) de forma subgengival 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia. Os animais foram sacrificados no 11º dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Em seguida, as hemiarcadas foram separadas, dissecadas, coradas em azul de metileno a 1%, montadas em cera utilidade e fotografadas. As imagens digitais foram submetidas à análise pelo software ImageJ. **A:** Maxila de animal normal que não foi submetido à DPE. **B:** Maxila de animal com DPE, no qual foi administrada salina, mostrando intensa destruição óssea alveolar e exposição das raízes. **C:** Maxila de animal submetido à DPE e que recebeu PVP revelando resultado semelhante ao anterior. **D:** Maxila de animal com DPE que recebeu GSNO 0,5 mmol L⁻¹ mostrando diminuição da perda óssea alveolar. **E:** Maxila de animal com DPE que recebeu GSNO 2 mmol L⁻¹ mostrando uma considerável redução da perda óssea alveolar. **F:** Maxila de animal sujeito a DPE no qual foi administrado GSNO 10 mmol L⁻¹, mostrando reabsorção óssea alveolar.

4.2 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)

Em animais com DPE que foram tratados com GSNO 2 mmol L⁻¹, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da variação da fosfatase alcalina óssea em relação aos grupos naive, salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (Figura 8).

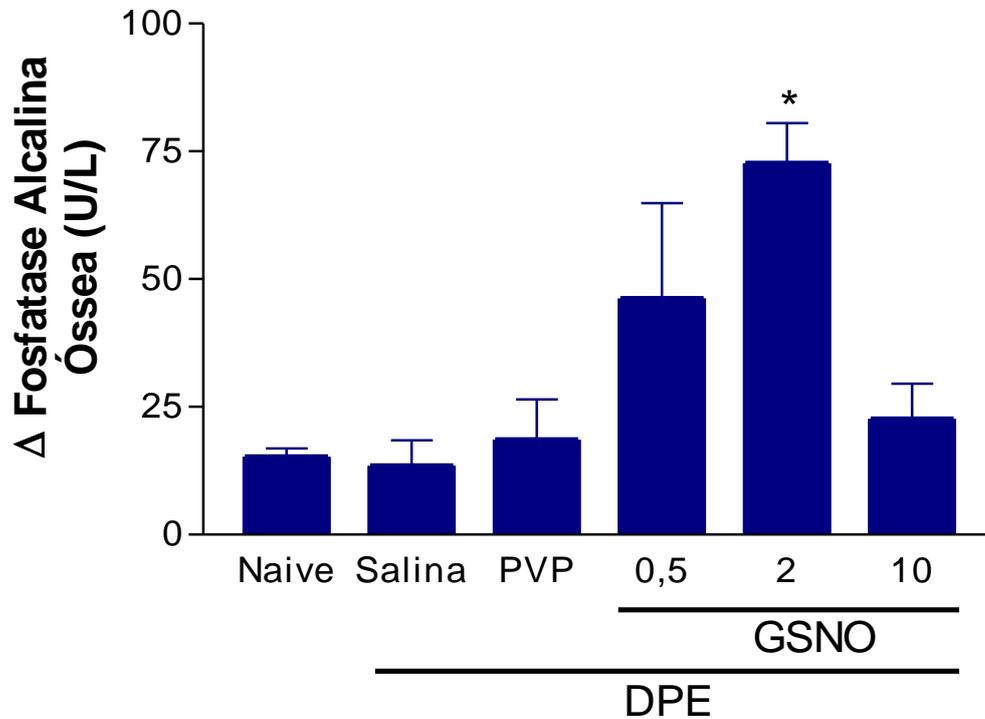


Figura 8: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea em ratos normais ou submetidos à doença periodontal experimental (DPE)

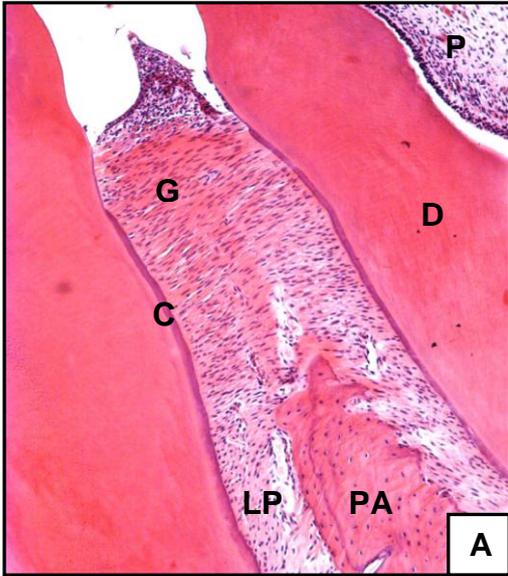
O sangue foi coletado do plexo orbital dos animais antes da indução da DPE e no dia do sacrifício. Foram realizadas as dosagens de fosfatase alcalina óssea inicial e final no soro obtido a partir do sangue coletado. Observou-se um significativo aumento da variação de fosfatase alcalina óssea nos animais que receberam GSNO 2 mmol L⁻¹. As barras representam a média ± EPM da diferença entre as dosagens de fosfatase alcalina óssea final e inicial (Δ). *p<0,05 em relação aos grupos naive, salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

4.3 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratas

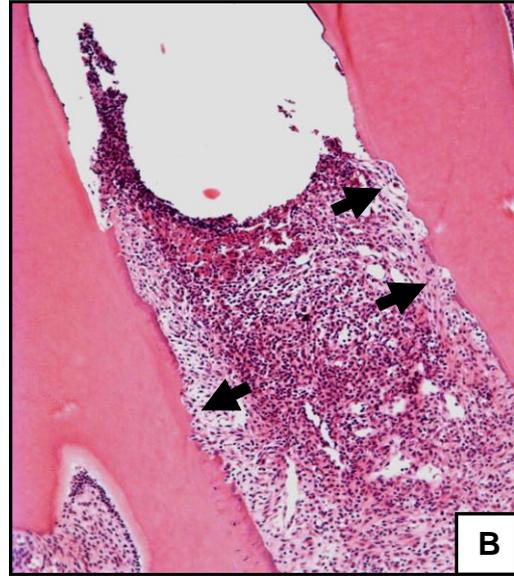
A análise histopatológica realizada aos 11 dias de DPE na região entre o 1º e o 2º molar superior esquerdo das ratas que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (Figura 9B, 9C e 9F, respectivamente), mostrou presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção do processo alveolar e destruição parcial do cimento, diferente da mesma região no grupo de animais normais, sem a doença, que apresentou estruturas preservadas (Figura 9A). As ratas que receberam GSNO 0,5 mmol L⁻¹, mostrou preservação parcial da integridade do processo alveolar e cimento, com presença de infiltrado celular inflamatório (Figura 9D). Nos animais tratados com GSNO 2 mmol L⁻¹ observou-se a presença de discreto infiltrado celular inflamatório e preservação do processo alveolar e cimento radicular (Figura 9E).

4.3.1 Tabela dos escores histopatológicos

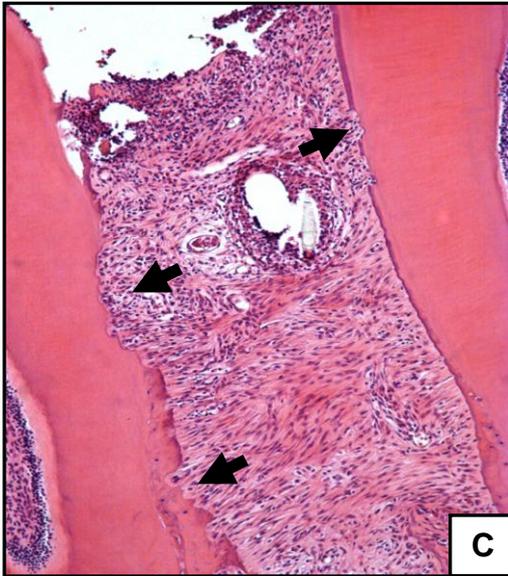
A partir dos cortes seriados das hemiarçadas, observou-se que o tratamento com GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ reduziu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) as alterações histopatológicas vistas na DPE, quando comparadas às observadas em animais que receberam apenas salina ou PVP (tabela 1).



Naive



DPE



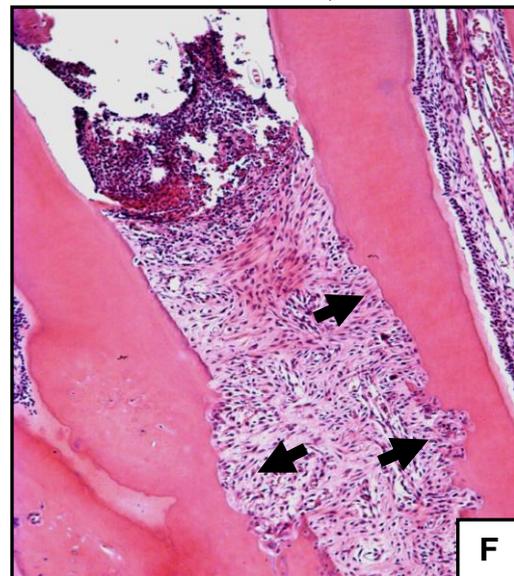
PVP



GSNO 0,5



GSNO 2



GSNO 10

Figura 9: Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos à DPE que receberam salina, PVP ou GSNO e de animal normal sem DPE na coloração hematoxilina-eosina (HE).

Os animais foram submetidos à indução da DPE através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos. As ratas receberam salina, PVP ou GSNO ($0,5$, 2 ou 10 mmol L^{-1}) subgengivalmente 30 minutos antes e diariamente após a indução da DPE. No 11º dia, foi feito o sacrifício dos animais com remoção das hemiarquadas, as quais foram processadas para coloração pelo método de HE. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE. **B.** Periodonto de animal submetido à DPE e que recebeu salina, apresentando presença de intenso infiltrado celular inflamatório, reabsorção do processo alveolar e do cimento radicular (setas). **C.** Periodonto de animal com DPE ao qual foi administrado PVP, mostrando características iguais ao anterior. **D.** Periodonto de animal com DPE que recebeu GSNO $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, onde se observa preservação parcial do processo alveolar e do cimento e presença de infiltrado inflamatório. **E.** Periodonto de animal submetido à DPE e tratado com GSNO 2 mmol L^{-1} , mostrando processo alveolar e cimento preservados e discreto infiltrado inflamatório. **F.** Periodonto de animal que com DPE ao qual foi administrado GSNO 10 mmol L^{-1} , apresentando infiltrado inflamatório intenso e perda do processo alveolar e reabsorção do cimento radicular. Aumento de 100x.

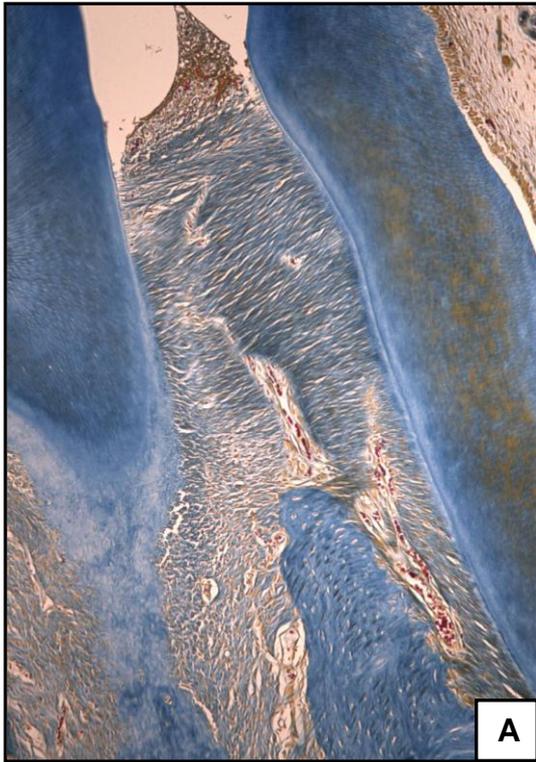
Tabela 1: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratas

	DPE					
	Naive	Salina	PVP	GSNO		
				0,5	2	10
Escores	0 (0-0)	3 (3-3)*	3 (3-3)*	1(1-2)*	1 (1-1)**	3 (2-3)*

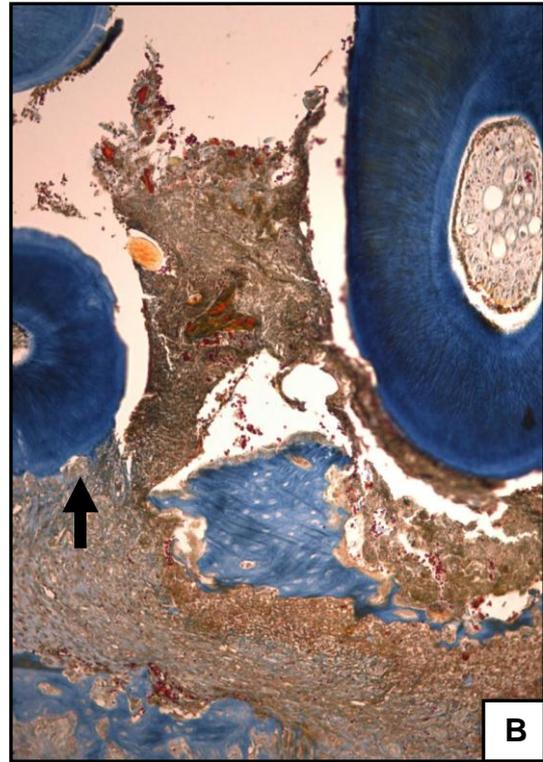
Os dados representam mediana e variação, onde as regiões entre o 1^o e o 2^o molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular inflamatório e preservação do processo alveolar e cemento. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (Kruskal-Wallis, Dunns).

4.4 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações das fibras colágenas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratas

A análise do periodonto corado pela técnica de tricrômio de Mallory revelou destruição do osso e do cemento bem como desorganização das fibras colágenas no periodonto dos animais submetidos à DPE e tratados com salina e PVP (figura 10B e 10C, respectivamente) quando comparados aos animais pertencentes ao grupo naive (figura 10A). GSNO na concentração de 2 mmol L⁻¹ (figura 10D) preveniu a reabsorção óssea e do cemento e a desorganização das fibras colágenas.



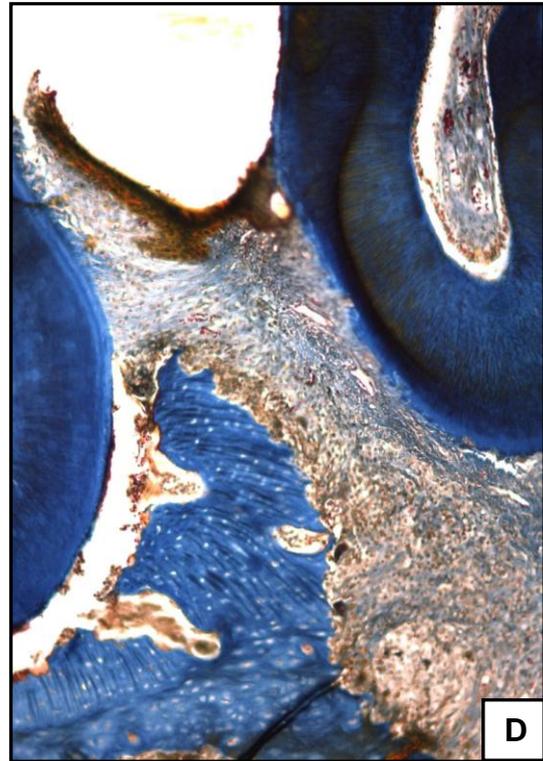
Naive



DPE



PVP



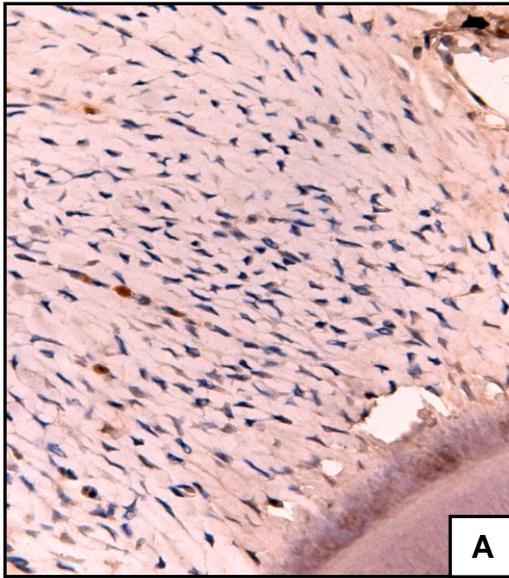
GSNO 2

Figura 10: Fotomicrografias de periodonto de animais submetidos à DPE, que receberam salina, PVP ou GSNO e de animal normal sem DPE na coloração Tricrômio de Mallory.

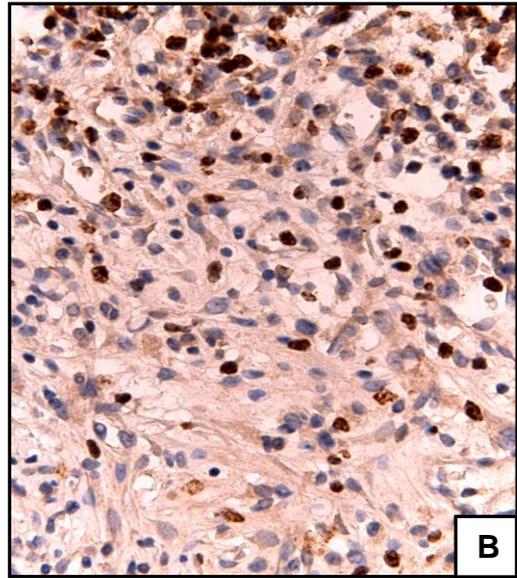
A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais receberam GSNO (0.5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, subgingival), PVP ou salina 30 minutos antes e diariamente após a cirurgia. No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais, com remoção das hemiarcadas, as quais foram processadas para coloração pelo método Tricrômio de Mallory. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE. **B.** Periodonto de animal submetido à DPE que recebeu salina, mostrando destruição óssea bem como das fibras colágenas do ligamento periodontal, além de destruição parcial do cimento (seta). **C.** Periodonto de animal com DPE ao qual foi administrado PVP, apresentando resultado semelhante ao anterior. **D.** Periodonto de animal submetido a DPE que recebeu GSNO 2 mmol L⁻¹ onde observou-se preservação parcial do processo alveolar e das fibras colágenas. Aumento de 100x.

4.5 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção de metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8) pelo método de imunohistoquímica

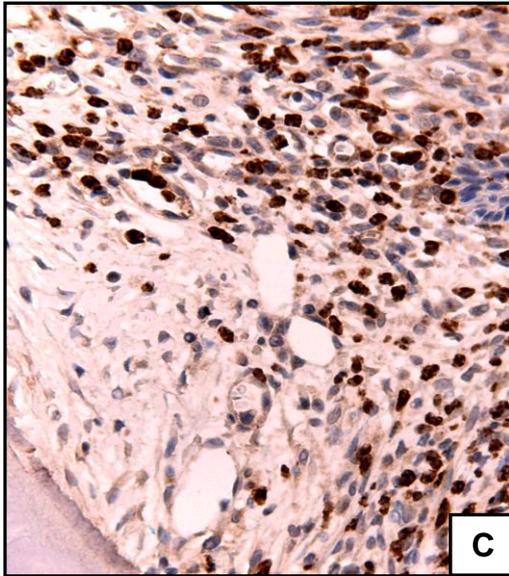
As ratas que foram submetidas à indução da DPE e que receberam apenas salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (figuras 11B, 11C ou 11F, respectivamente) apresentaram grande quantidade de células do tecido conjuntivo do ligamento periodontal imunomarcadas para MMP-1/-8, quando comparadas ao grupo naive, onde a marcação é praticamente nula (figura 11A). Nos animais submetidos à DPE nos quais foram administrados GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ (figura 11D e 11E) houve uma diminuição considerável da marcação para as collagenases, indicando que nestas concentrações, o GSNO foi capaz de inibir a expressão desta enzima.



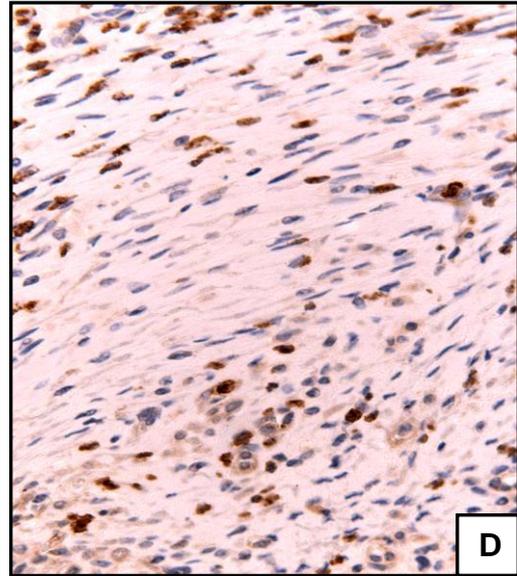
Naive



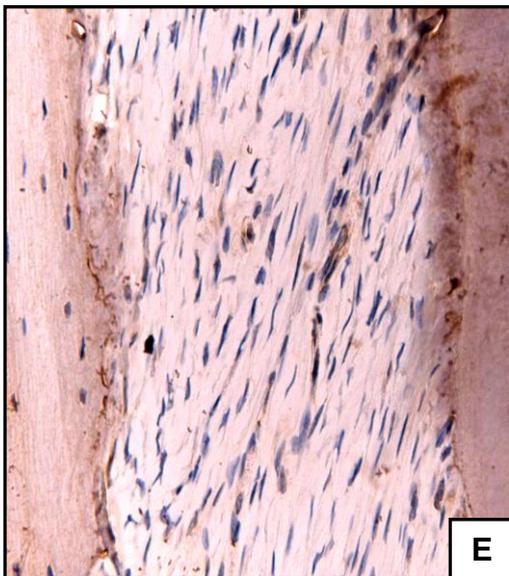
DPE



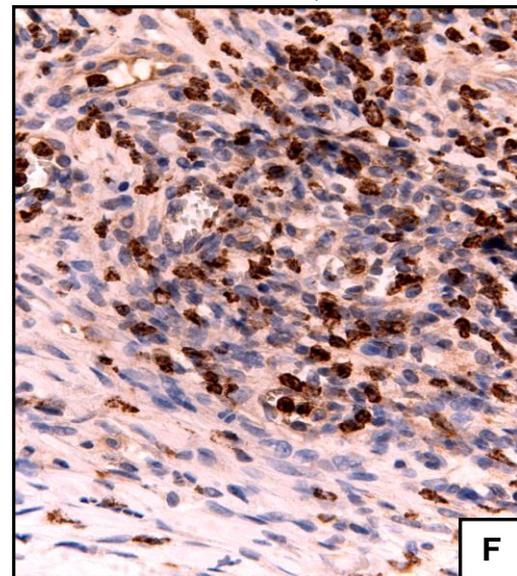
PVP



GSNO 0,5



GSNO 2



GSNO 10

Figura 11: Imunohistoquímica para metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO

As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina, PVP ou GSNO ($0,5$, 2 ou 10 mmol L^{-1}) de forma subgengival diariamente até o dia do sacrifício. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE, mostrando ausência quase total de imunomarcção para MMP-1/-8. **B.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE e que recebeu salina, mostrando grande quantidade de células mononucleares marcadas. **C.** Periodonto de animal com DPE no qual foi administrado PVP, mostrando características iguais ao anterior. **D.** Periodonto de animal submetido a DPE e que recebeu GSNO $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ mostrando diminuição da marcação para MMP-1/-8. **E.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE no qual foi administrado GSNO 2 mmol L^{-1} , mostrando ausência quase total de marcação para MMP-1/-8. **F.** Periodonto de animal com DPE e que recebeu GSNO 10 mmol L^{-1} apresentando intensa marcação para MMP-1/-8. Aumento 400x.

4.6 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a medida de atividade de mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas

A MPO é uma enzima que está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido (BRADLEY et al, 1982). Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da MPO na 6ª hora após a indução da DPE nos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ quando comparados ao grupo naive. O GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ diminuiu a atividade de MPO ($p < 0,05$), indicando redução da quantidade de neutrófilos no tecido, sendo estatisticamente diferentes dos grupos salina e PVP (Figura 12).

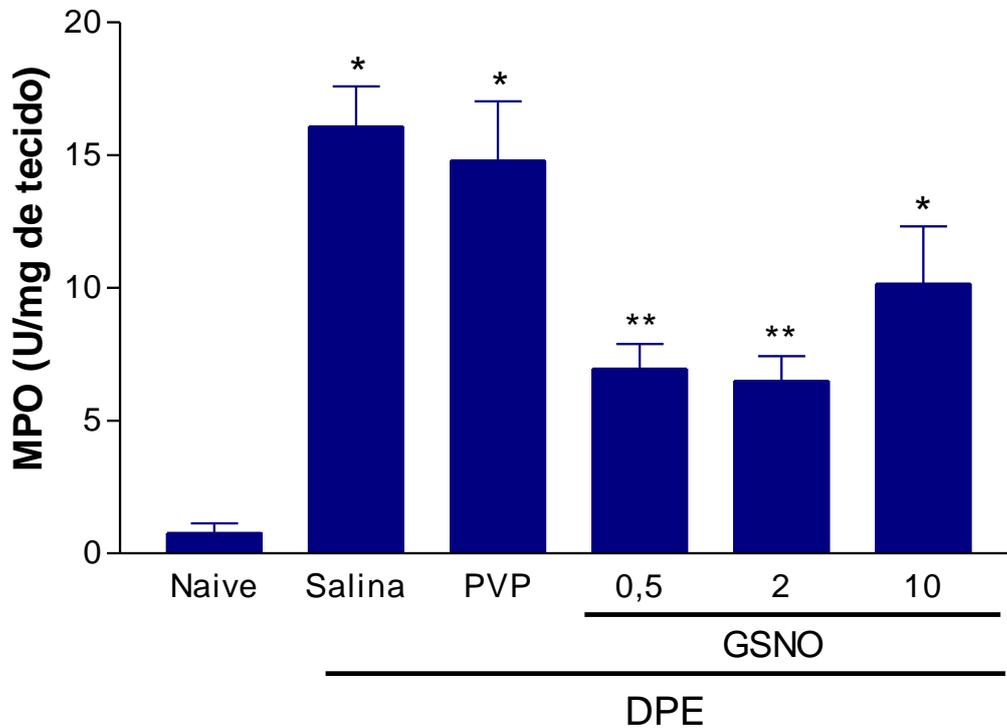


Figura 12: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)

Os animais foram submetidos à indução da DPE através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. As ratas receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) subgengivalmente trinta minutos antes da cirurgia, sendo sacrificadas 6 horas após a mesma. Nos animais que receberam salina ou PVP, observou-se um significativo aumento na atividade de MPO, enquanto que nos grupos GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹, este parâmetro diminuiu. As barras representam média ± EPM de unidades de MPO/mg de tecido. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos com DPE e que receberam apenas salina ou PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.7 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de citocinas nas gengivas de ratas

4.7.1 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) nas gengivas de ratas

As ratas que foram submetidas à DPE e que receberam apenas salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ apresentaram aumento da quantidade de IL-1 β (p<0,05) no tecido gengival quando comparadas aos animais normais sem a doença. A administração de GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ promoveu uma significativa diminuição (p<0,05) da produção de IL-1 β nas gengivas das ratas em relação aos grupos salina e PVP (Figura 13).

4.7.2 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nas gengivas de ratas

Nos grupos de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹, observou-se um aumento significativo (p<0,05) na quantidade de TNF- α nos tecidos gengivais quando comparados ao grupo naive. Nos animais que receberam GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹, foi constatado uma redução desta citocina de forma significativa (p<0,05) em relação aos grupos salina e PVP (Figura 14).

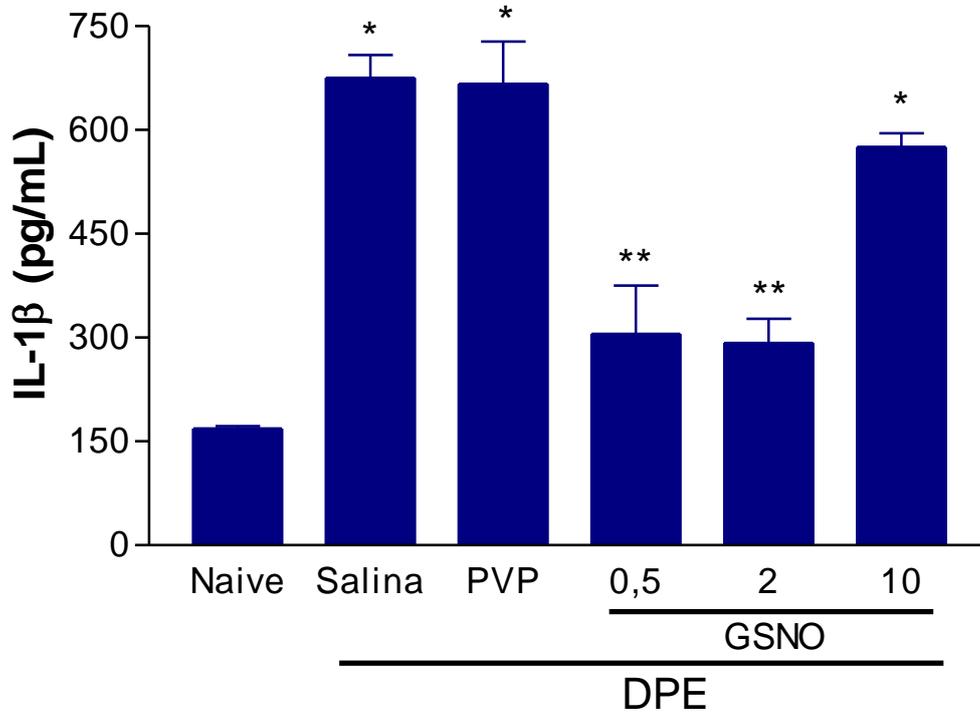


Figura 13: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) em gengivas de ratas normais ou submetidas à doença periodontal experimental (DPE)

As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) subgengivalmente trinta minutos antes da cirurgia e diariamente durante 11 dias. As gengivas na região dos molares superiores esquerdos foram removidas, sendo processadas para análise de IL-1 β por ELISA. Observou-se um aumento na produção de IL-1 β nos animais tratados com salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ em relação ao grupo naive. O tratamento com GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ diminuíram a produção de IL-1 β nas gengivas das ratas submetidas à indução da DPE quando comparados ao grupo salina e PVP. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

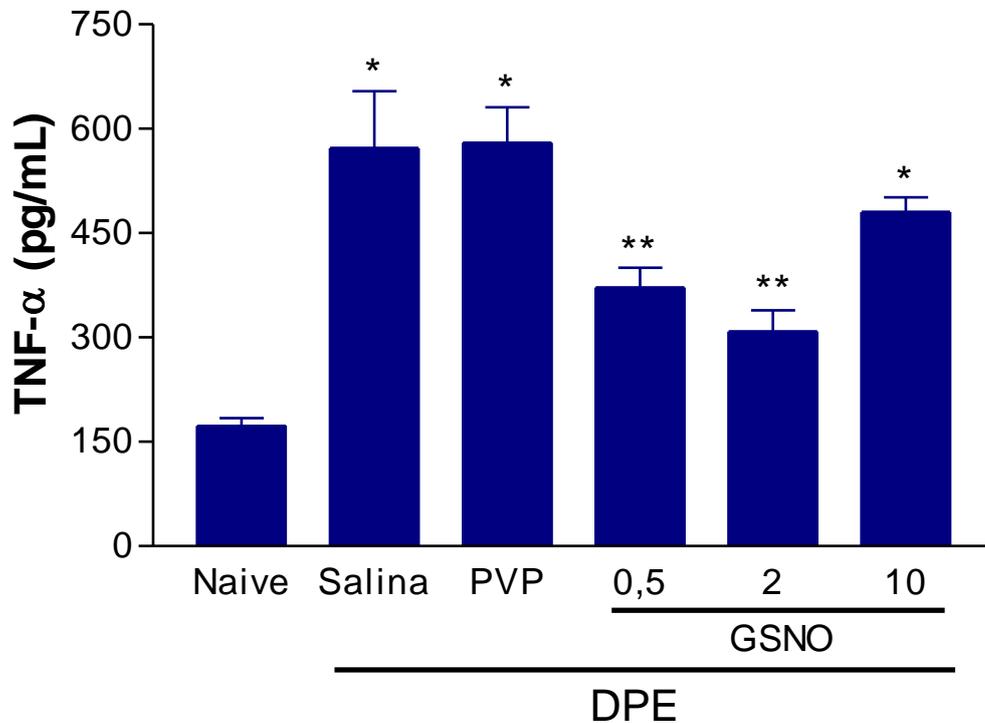
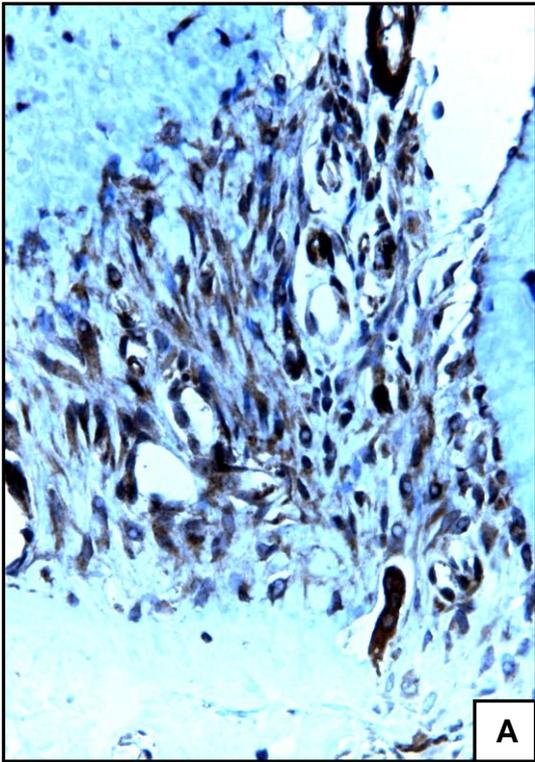


Figura 14: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE)

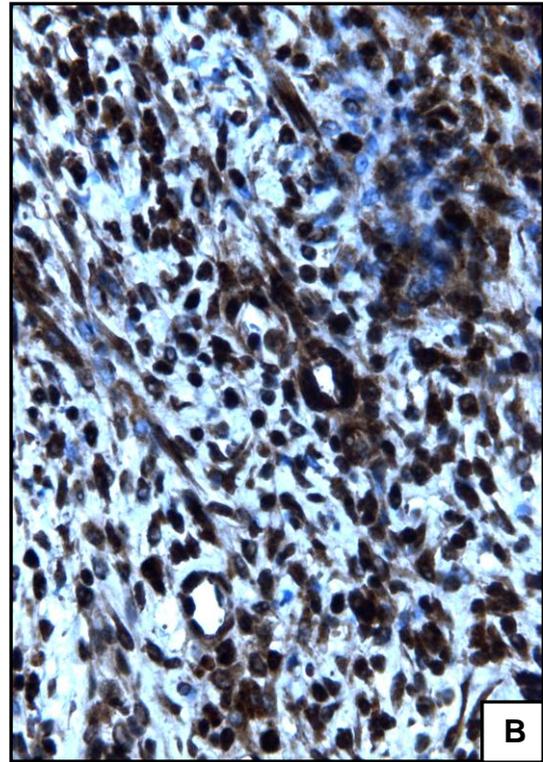
A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ administrados subgengivalmente 30 minutos antes da indução da DPE e durante os 11 dias subseqüentes aumentou significativamente a produção de TNF- α em relação ao grupo naive. A administração de GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ inibiu de forma significativa a formação de TNF- α no tecido gengival de ratas submetidos à DPE, sendo comparável ao grupo naive. *p<0,05 indica diferença estatística em relação ao grupo naive. ** p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.8 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear-κB (NF-κB) pelo método de imunohistoquímica

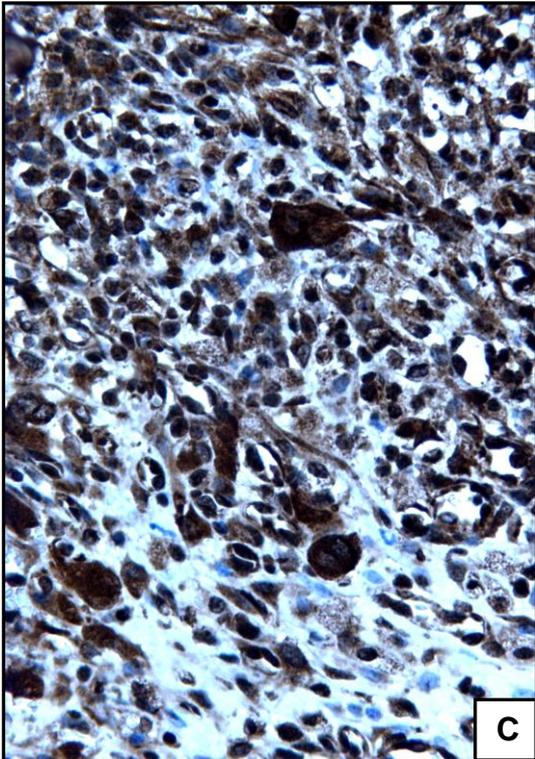
Os animais nos quais foi induzida a DPE e administrados salina ou PVP (figuras 15B e 15C, respectivamente), apresentaram grande quantidade de células do tecido conjuntivo do periodonto imunomarcadas para NF-κB, o que não foi encontrado no grupo naive (figura 15 A). O tratamento com GSNO 2 mmol L⁻¹ (Figura 15D) reduziu a imunomarcção para NF-κB.



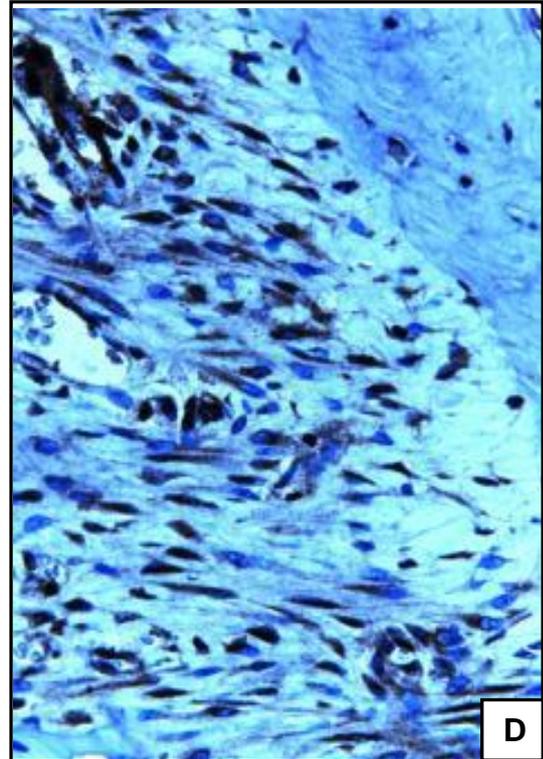
Naive



DPE



PVP



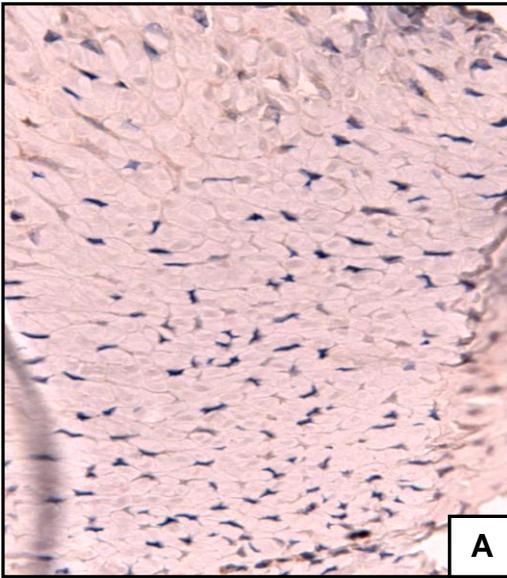
GSNO 2

Figura 15: Imunohistoquímica para a fração dissociada p50 NLS do fator nuclear- κ B (NF- κ B) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO

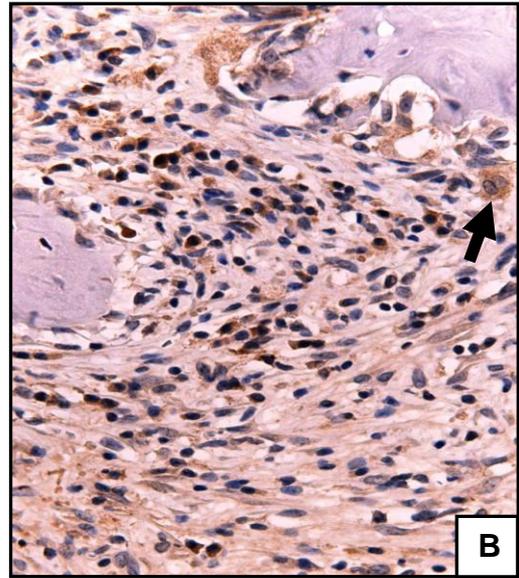
As ratas foram submetidas à indução da DPE através da colocação cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos e receberam salina, PVP ou GSNO 2 mmol L⁻¹, subgingivalmente, 30 minutos antes da cirurgia e diariamente durante 11 dias. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE, mostrando pouca marcação para NF- κ B. **B.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE e que recebeu salina, mostrando intensa marcação para NF- κ B. **C.** Periodonto de animal com DPE no qual foi administrado PVP após a cirurgia, mostrando características iguais ao anterior. **D.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE no qual foi administrado GSNO 2 mmol L⁻¹, mostrando redução da marcação para NF- κ B. Aumento 400x.

4.9 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a imunomarcção para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) pelo método de imunohistoquímica

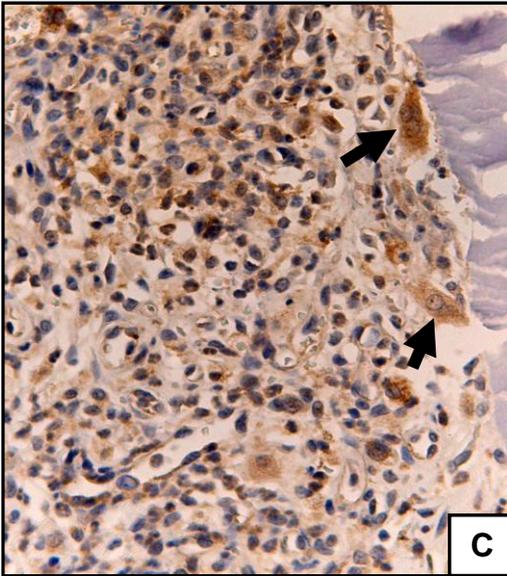
Observou-se uma acentuada marcação imunohistoquímica para NOSi nas células do ligamento periodontal, especialmente nos osteoclastos (setas), dos animais submetidos à DPE que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (Figura 16B, 16C e 16F, respectivamente) em relação à marcação observada na gengiva das ratas pertencentes ao grupo naive (Figura 16A). O tratamento com GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (Figura 16D e 16E, respectivamente) reduziu a marcação para NOSi.



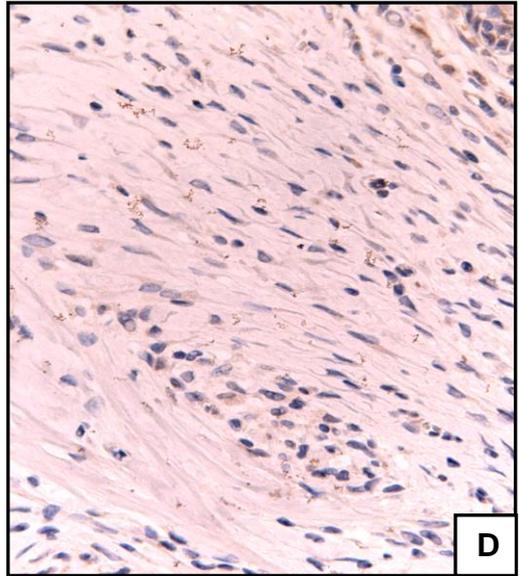
Naive



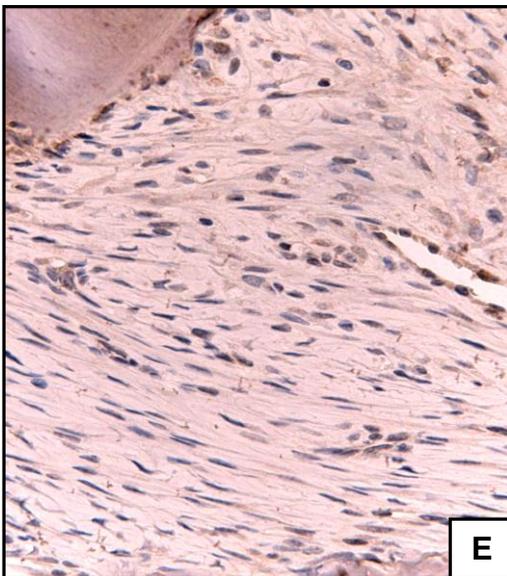
DPE



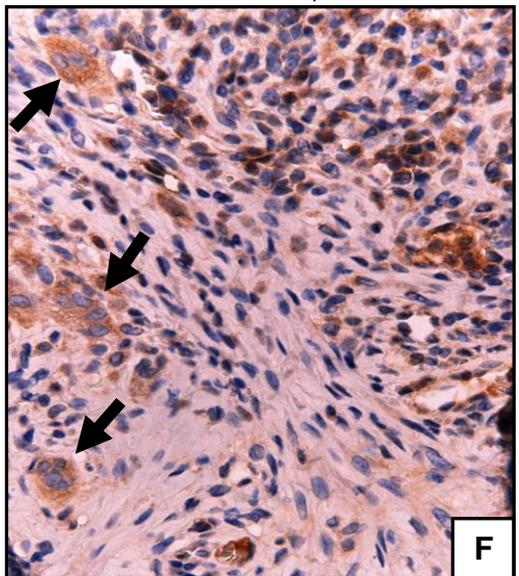
PVP



GSNO 0,5



GSNO 2



GSNO 10

Figura 16: Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (NOSi) do periodonto de animais normais e de animais submetidos à DPE e que receberam salina, PVP ou GSNO.

GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹), PVP ou salina foram administrados de forma subgengival 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias após a indução da DPE. A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais foram sacrificados 11 dias após o procedimento cirúrgico. **A.** Periodonto de animal normal sem DPE, mostrando ausência quase total de imunomarcção para NOSi. **B.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE e que recebeu salina, mostrando intensa marcação para NOSi, especialmente nos osteoclastos (setas). **C.** Periodonto de animal com DPE no qual foi administrado PVP após a cirurgia, mostrando características iguais ao anterior. **D.** Periodonto de animal submetido à DPE e que recebeu GSNO 0,5 mmol L⁻¹ mostrando uma diminuição da imunomarcção para NOSi. **E.** Periodonto de animal que foi submetido à DPE no qual foi administrado GSNO 2 mmol L⁻¹, mostrando redução da marcação para NOSi. **F.** Periodonto de animal com DPE e que recebeu GSNO 10 mmol L⁻¹ apresentando grande marcação para NOSi. Aumento 400x.

4.10 Efeito do S-nitrosoglutathione (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) em gengivas de ratas

A dosagem de nitrito/nitrato (NOx) é utilizada como indicador da produção de NO. Em todos os grupos, houve um aumento significativo sobre a produção de NOx em relação ao grupo naïve. Os animais que receberam GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na dosagem de NOx quando comparados aos animais pertencentes aos grupos salina e PVP (Figura 17).

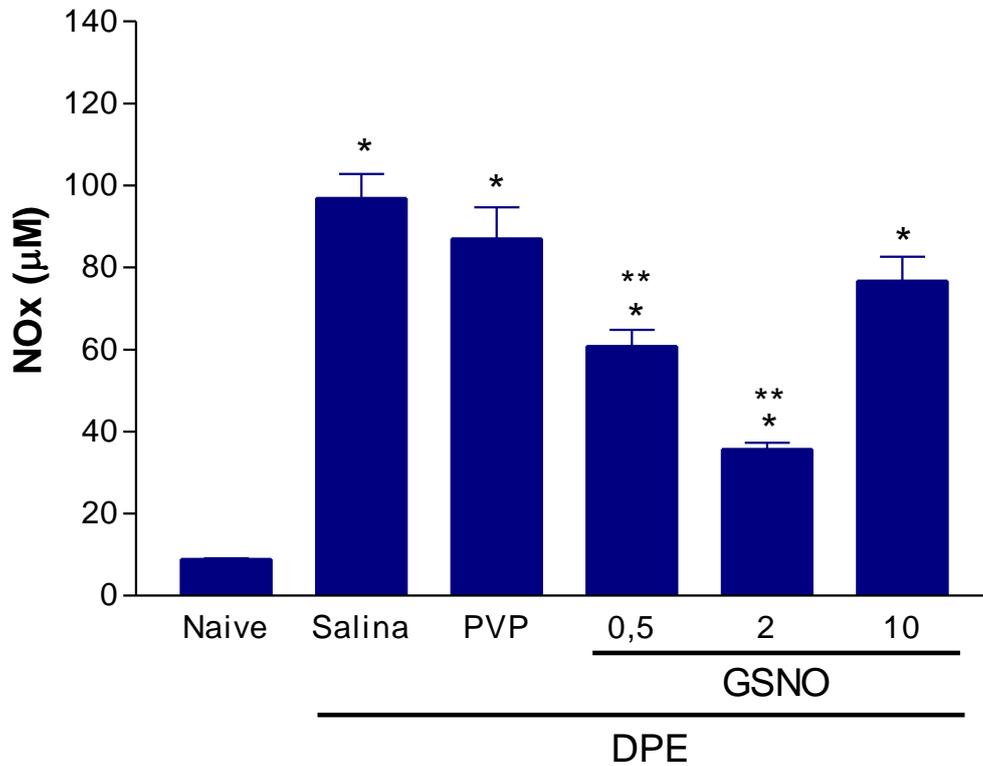


Figura 17: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração do nitrito/nitrato (NOx) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE).

GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹), PVP ou salina foram administrados subgengivalmente 30 minutos antes e diariamente após a indução da DPE. A DPE foi induzida através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais foram sacrificados 11 dias após o procedimento cirúrgico. A administração de GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ diminuiu a concentração de NOx na gengiva em relação ao grupo salina e PVP. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.11 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em gengiva de ratas

Em todos os grupos, houve uma redução dos níveis de GSH ($p < 0,05$) sendo estatisticamente diferentes do grupo naive. GSNO 2 mmol L^{-1} promoveu um aumento significativo na concentração de GSH, mostrando que houve redução do consumo de glutathiona ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos salina, PVP, GSNO $0,5$ e 10 mmol L^{-1} (Figura 18).

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

Nos grupos de animais com DPE e tratados com salina ou PVP, observou-se um aumento significativo dos níveis de MDA ($p < 0,05$) em relação ao grupo naive. Houve uma diminuição significativa do aumento da concentração de MDA ($p < 0,05$) em animais com DPE e que receberam GSNO 2 mmol L^{-1} , quando comparado aos grupos salina e PVP (Figura 19).

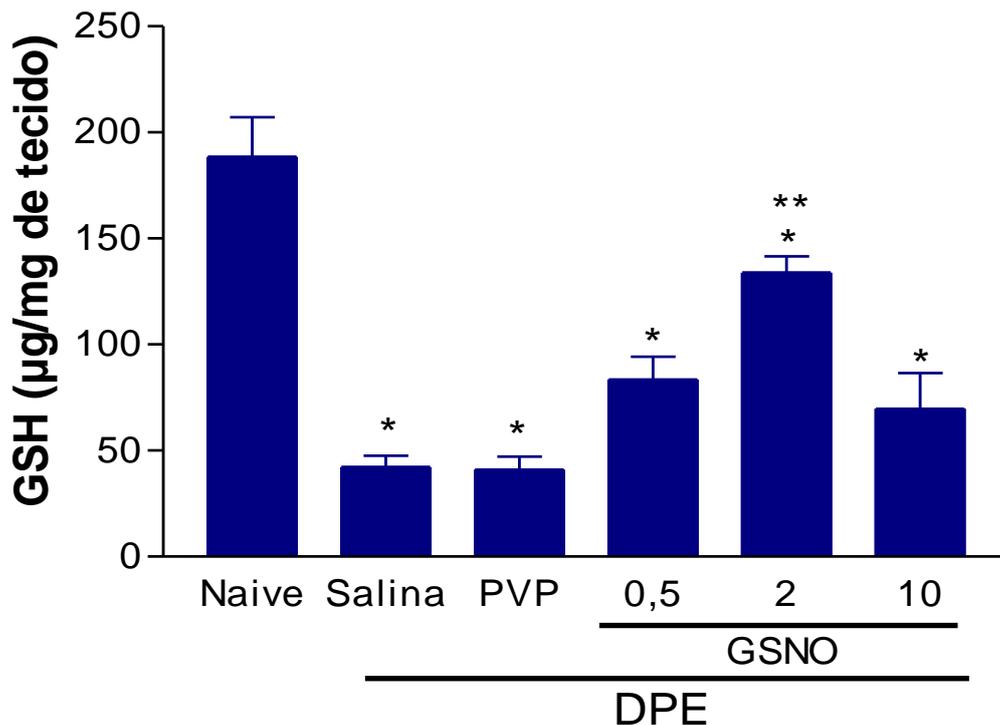


Figura 18: Efeito do S-nitrosoglutatona (GSNO) sobre a concentração de glutatona reduzida (GSH) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental (DPE).

Os animais foram submetidos à indução da DPE através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos. As ratas receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, subgengival) 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias. No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais, com remoção das gengivas. Houve um aumento na concentração de GSH nos animais que receberam GSNO 2 mmol L⁻¹ quando comparado aos animais pertencentes aos grupos salina e PVP. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina, PVP, GSNO 0,5 e 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

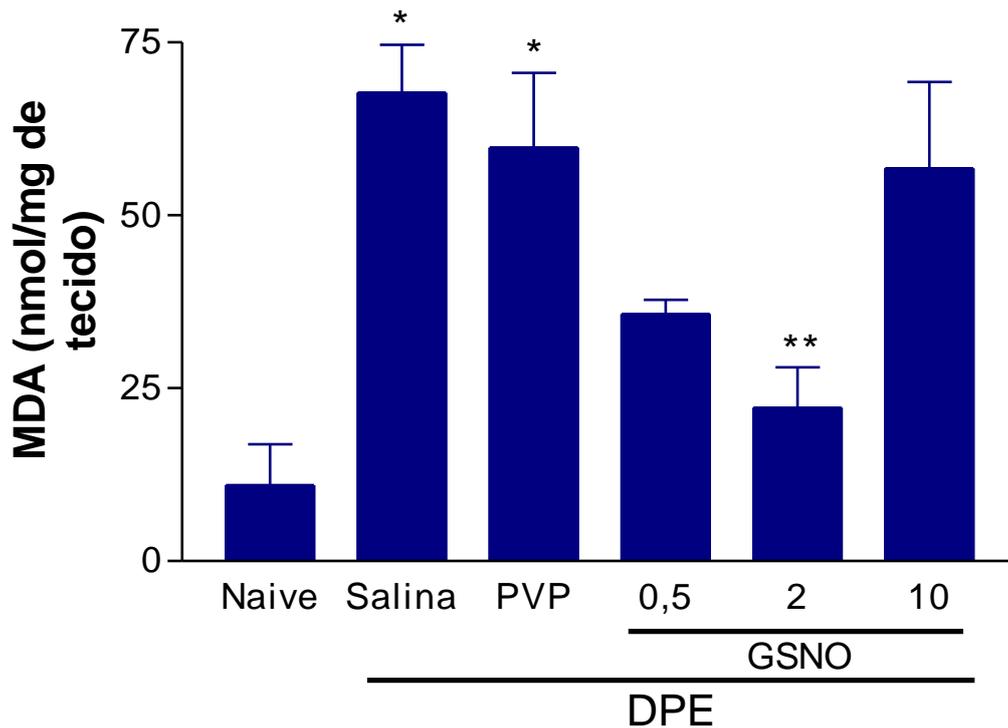


Figura 19: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de malondialdeído (MDA) na gengiva de ratas submetidas à doença periodontal experimental.

Os animais foram submetidos à indução da DPE por corpo estranho e receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) subgengivalmente 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias. No 11º dia foi feito o sacrifício dos animais, com remoção das gengivas. Houve uma redução na concentração de MDA em animais nos quais foram administrados GSNO 2 mmol L⁻¹ em relação aos grupos salina e PVP. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP. (ANOVA, Bonferroni).

4.13 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a migração de leucócitos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite induzida por carragenina

4.13.1 Efeito do GSNO sobre a migração de leucócitos totais no exsudato peritoneal

O pré-tratamento com GSNO 2 mmol L⁻¹, diferentemente das concentrações 0,5 e 10 mmol L⁻¹, diminuiu significativamente o número de leucócitos na cavidade peritoneal após 4 horas do estímulo inflamatório (carragenina) em relação aos animais dos grupos salina e PVP (Figura 20).

4.13.2 Efeito do GSNO sobre a migração de polimorfonucleares no exsudato peritoneal

O GSNO nas concentrações 0,5 e 2 mmol L⁻¹, mas não na de 10 mmol L⁻¹, reduziu significativamente a migração de neutrófilos induzida pela carragenina para a cavidade peritoneal quando comparados aos grupos salina e PVP (Figura 21).

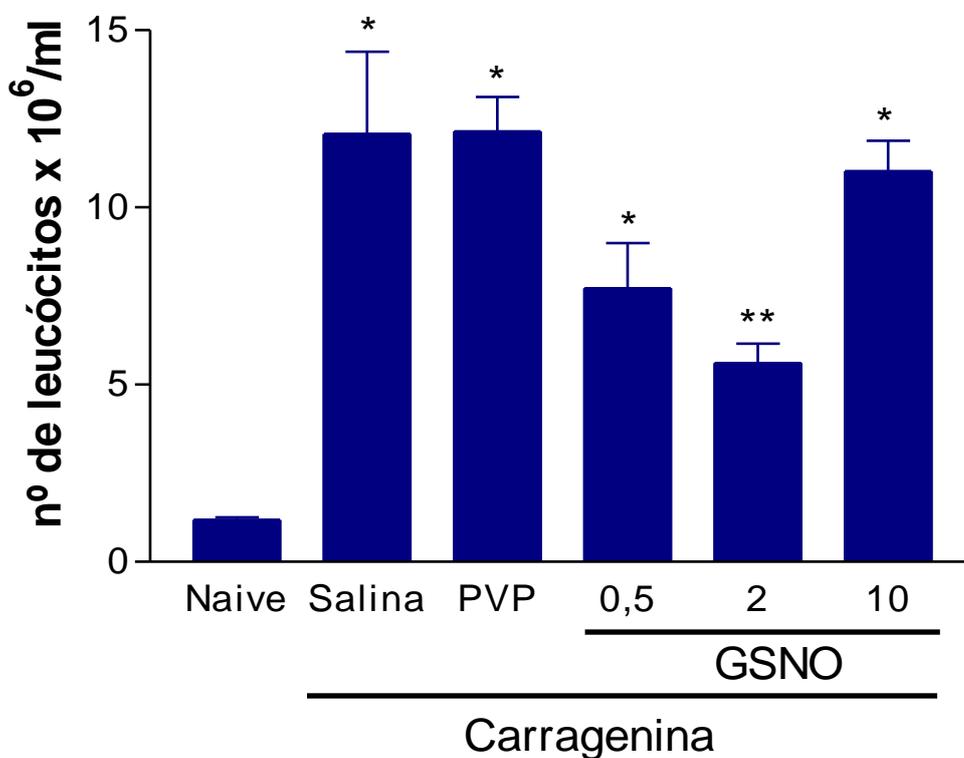


Figura 20: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a migração de leucócitos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite.

Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) foram administrados 1 hora antes da indução da peritonite com carragenina (500µg/ml). Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório. Observou-se aumento significativo do número de leucócitos na cavidade peritoneal nos grupos que receberam salina, PVP ou GSNO 0,5 ou 10 mmol L⁻¹ tratados com carragenina em relação ao grupo naive. Houve diminuição significativa do número de leucócitos na cavidade peritoneal no grupo que recebeu GSNO 2 mmol L⁻¹ quando comparado aos grupos salina e PVP. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP. (ANOVA, Bonferroni).

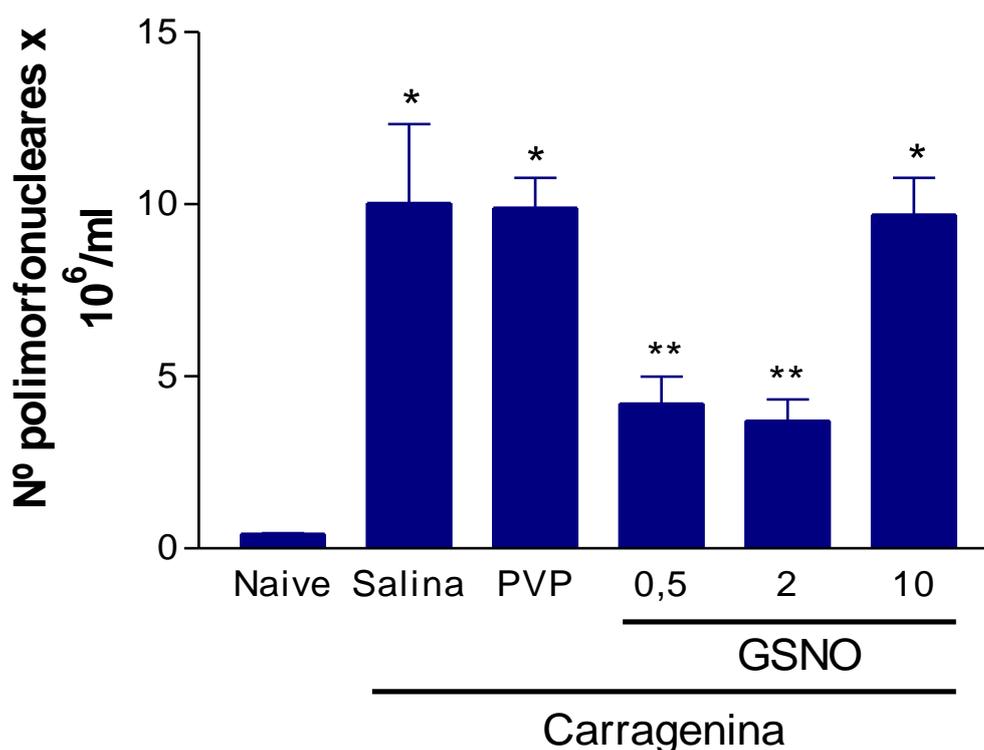


Figura 21: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a migração de neutrófilos no exsudato peritoneal em modelo de peritonite.

A peritonite foi induzida através da administração de carragenina (500 μ g/ml, i.p.). Foram administrados salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) intraperitonealmente 1 hora antes e os animais sacrificados 4 horas após a indução da inflamação. Houve um aumento significativo na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal nos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ tratados com carragenina quando comparados ao grupo naive. O GSNO nas concentrações 0,5 e 2 mmol L⁻¹ reduziu de forma significativa a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal em relação aos grupos salina e PVP. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e PVP. (ANOVA, Bonferroni).

4.14 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal em modelo de peritonite

A administração de GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹, diferentemente do GSNO 10 mmol L⁻¹, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o aumento da atividade de MPO induzido por carragenina na cavidade peritoneal quando comparado aos animais dos grupos salina e PVP (Figura 22).

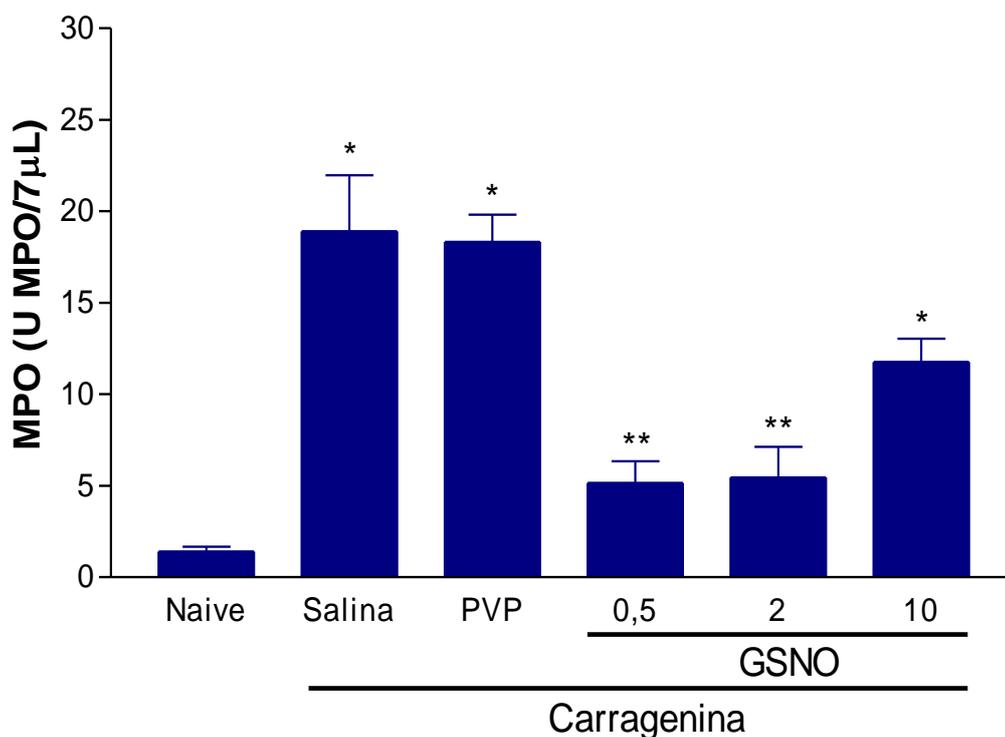


Figura 22: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal.

As ratas receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) 1 hora antes da indução da peritonite com carragenina (500µg/ml), sendo sacrificadas 4 horas após a mesma. A atividade da MPO nos grupos salina e PVP aumentou significativamente quando comparada ao grupo naive. GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹, diferentemente do GSNO 10 mmol L⁻¹, reduziu significativamente o aumento da atividade de MPO induzido por carragenina, sendo estatisticamente diferentes dos grupos salina e PVP. As barras representam média ± EPM de unidades de MPO/7 µL de exsudato. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação ao grupo salina ou PVP. (ANOVA, Bonferroni).

4.15 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de citocinas no exsudato peritoneal em modelo de peritonite induzida por carragenina

4.15.1 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no exsudato peritoneal

As ratas que receberam apenas salina ou PVP apresentaram excessiva produção de IL-1 β ($p < 0,05$) no lavado peritoneal sendo estatisticamente diferente dos animais do grupo naive. Observou-se que as concentrações de GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ preveniram de modo significativo ($p < 0,05$) o aumento da concentração de IL-1 β induzido por carragenina quando comparados aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (Figura 23).

4.15.2 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no exsudato peritoneal

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de TNF- α no lavado peritoneal nos animais pertencentes aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ em relação ao grupo naive. O GSNO 2 mmol L⁻¹ preveniu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento da concentração desta citocina induzido por carragenina na cavidade peritoneal quando comparado aos grupos salina e PVP (Figura 24).

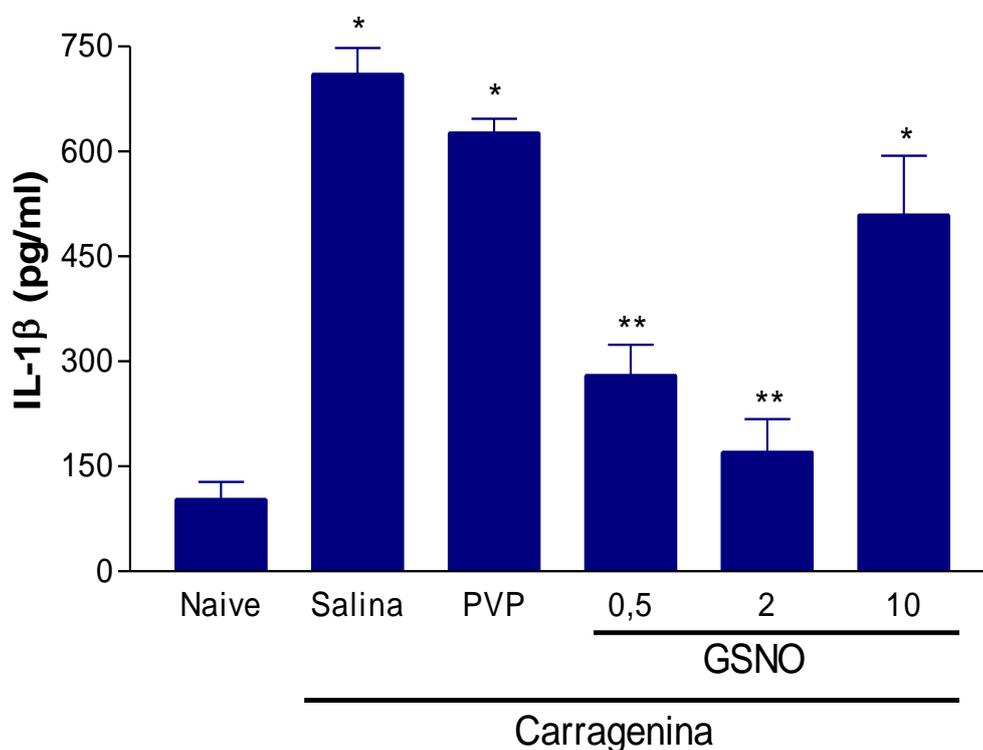


Figura 23: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no exsudato peritoneal.

Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) foram administrados 1 hora antes da indução da peritonite com carragenina (500 μ g/ml). Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório. Observou-se um aumento significativo na produção de IL-1 β no lavado peritoneal nos grupos que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ em relação ao grupo naive. GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ preveniram significativamente o aumento da concentração de IL-1 β induzido por carragenina no exsudato peritoneal quando comparados aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

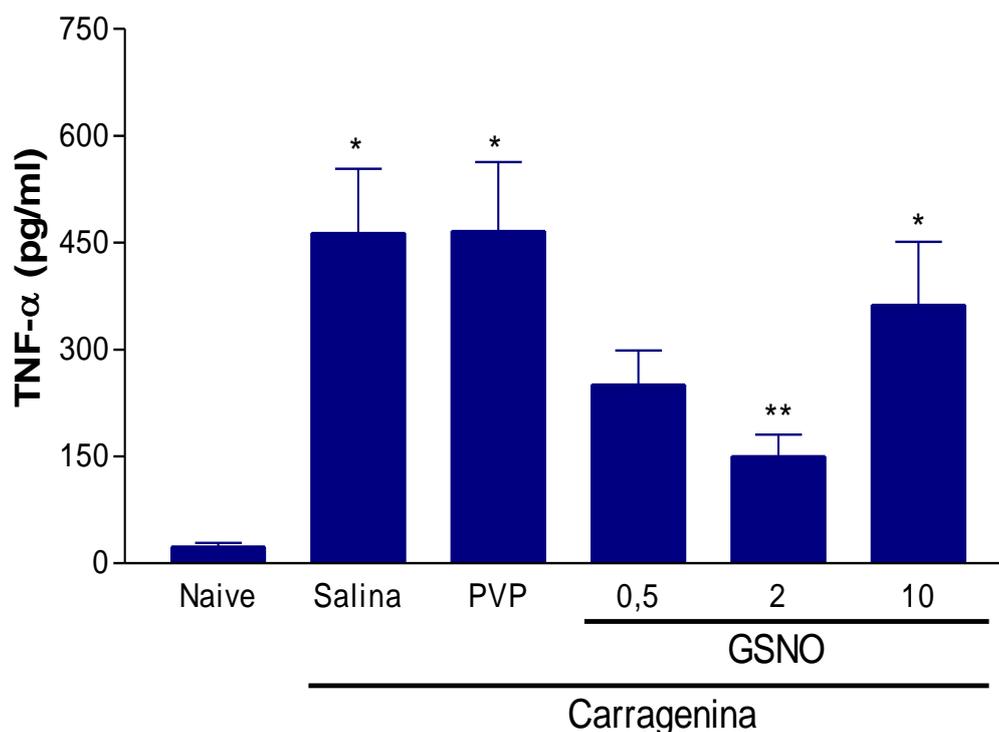


Figura 24: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no exsudato peritoneal.

A peritonite foi induzida através da administração de carragenina (500 μ g/ml, i.p.). Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, i.p.) foram administrados 1 hora antes e os animais sacrificados 4 horas após a indução da inflamação. Houve um aumento significativo na produção de TNF na cavidade peritoneal nos grupos salina e PVP quando comparados ao grupo naive. O GSNO 2 mmol L⁻¹ preveniu significativamente o aumento da concentração desta citocina induzido por carragenina no exsudato peritoneal quando comparados aos grupos salina e PVP. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.16 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no exsudato peritoneal

No lavado peritoneal, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da produção de NOx no exsudato peritoneal dos animais pertencentes aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L^{-1} em relação às ratas do grupo naive. O pré-tratamento com GSNO 2 mmol L^{-1} preveniu significativamente ($p < 0,05$) o aumento de NOx induzido por carragenina no exsudato peritoneal quando comparado aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L^{-1} (Figura 25).

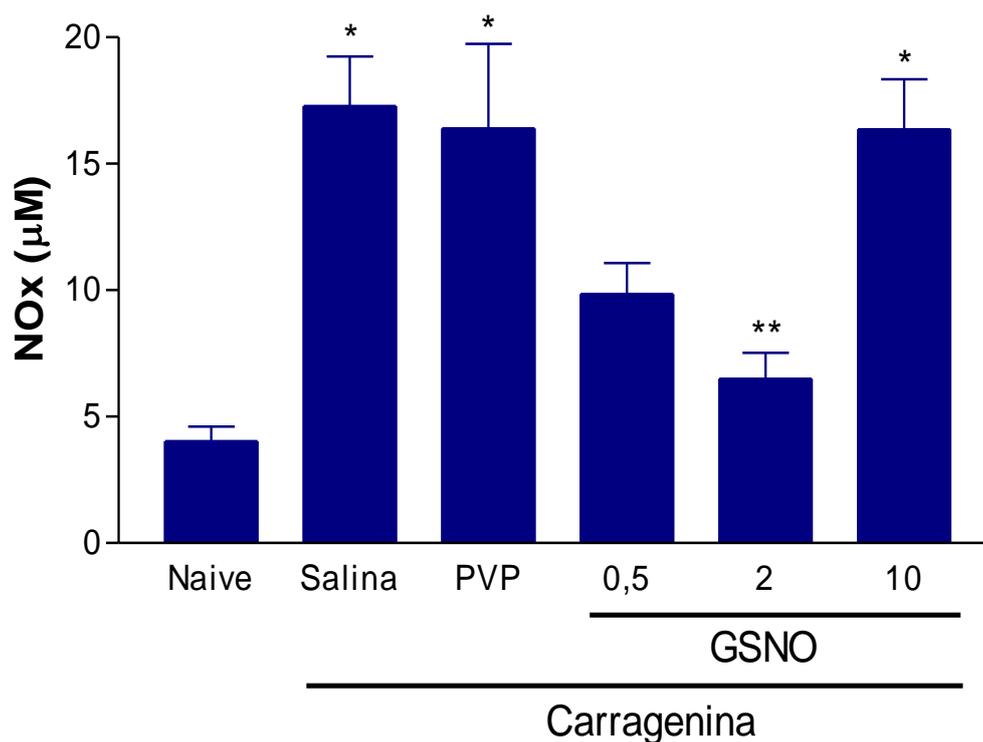


Figura 25: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no exsudato peritoneal.

Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) foram administrados 1 hora antes da indução da peritonite com carragenina (500µg/ml). Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório. Observou-se um aumento significativo na produção de NOx no lavado peritoneal nos grupos que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ em relação ao grupo naive. O GSNO 2 mmol L⁻¹ preveniu de forma significativa (p<0,05) o aumento de NOx induzido por carragenina quando comparados aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

4.17 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no exsudato peritoneal

Os níveis de GSH no lavado peritoneal dos animais pertencentes aos grupos salina, PVP, GSNO 0,5 e 10 mmol L⁻¹ mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos dos animais do grupo naive. Nos grupos GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de GSH em relação aos grupos salina e PVP (Figura 26).

4.18 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no exsudato peritoneal

Os animais pertencentes aos grupos salina e PVP mostraram um significativo aumento ($p < 0,05$) na concentração de MDA do lavado peritoneal em relação às ratas do grupo naive. Observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de MDA no exsudato peritoneal no grupo que recebeu GSNO 2 mmol L⁻¹ em relação aos grupos salina e PVP (Figura 27).

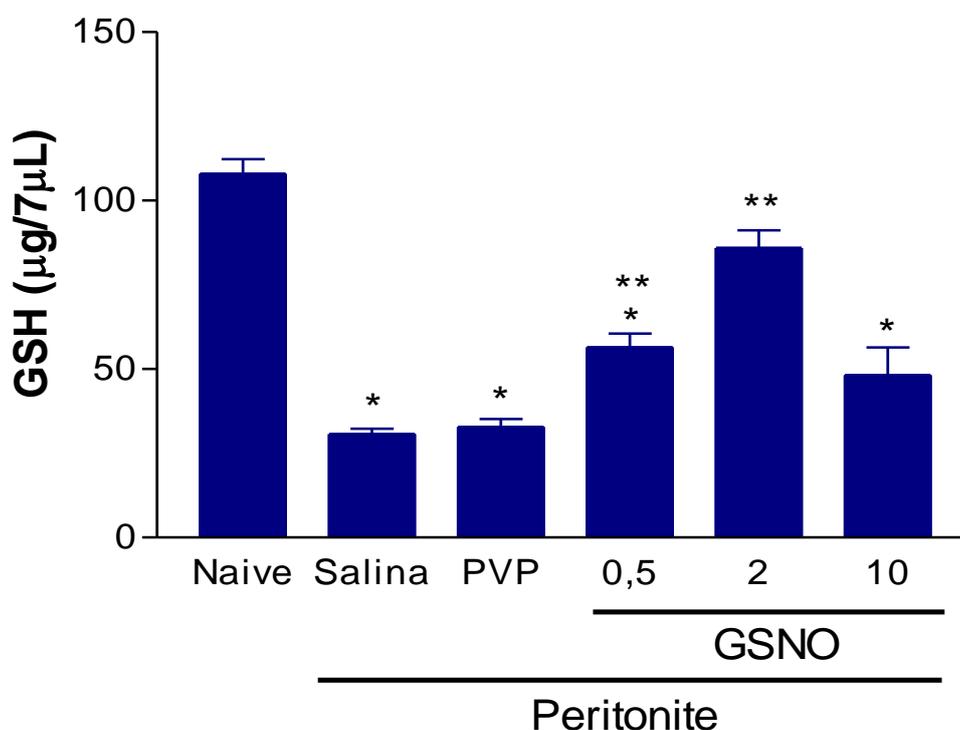


Figura 26: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutatona reduzida (GSH) no exsudato peritoneal.

A peritonite foi induzida através da administração de carragenina (500µg/ml, i.p.). Os animais receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, subgengival) 1 hora antes e foram sacrificados 4 horas após a indução da inflamação. Houve uma redução significativa nos níveis de GSH nos grupos salina, PVP, GSNO 0,5 e 10 mmol L⁻¹ quando comparados ao grupo naive. O GSNO nas concentrações 0,5 e 2 mmol L⁻¹ aumentou os níveis de GSH de forma significativa no lavado peritoneal em relação aos grupos salina e PVP, sendo que o aumento da concentração de GSH no grupo que recebeu GSNO 2 mmol L⁻¹ também foi estatisticamente diferente dos grupos GSNO 0,5 e 10 mmol L⁻¹. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p < 0,001 em relação ao grupo naive. **p < 0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

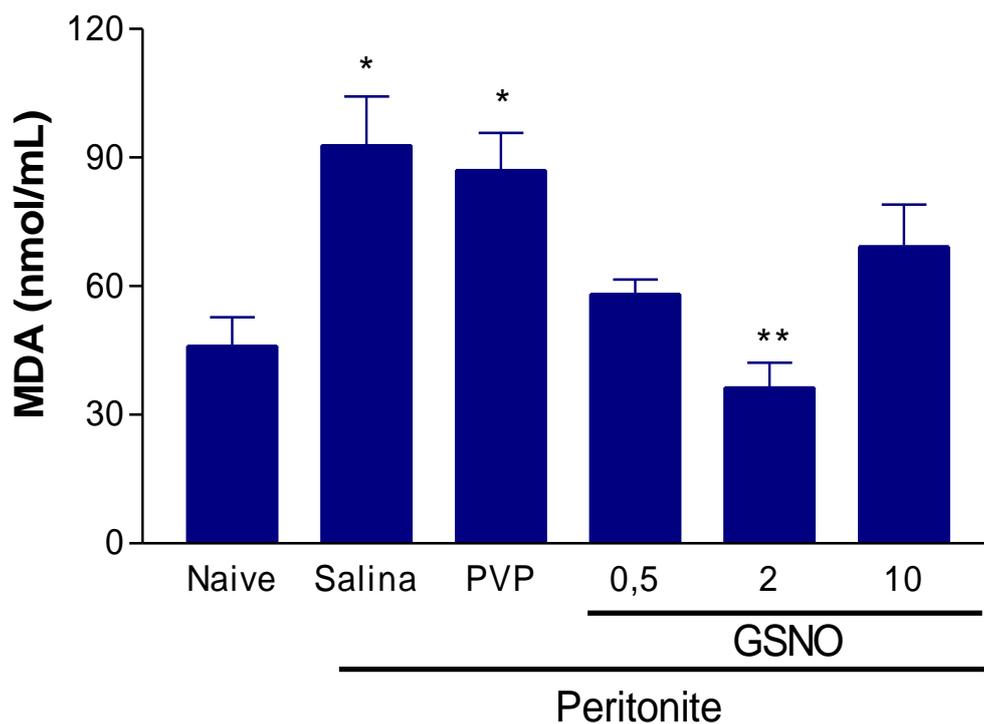


Figura 27: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de malondialdeído (MDA) no exsudato peritoneal.

A peritonite foi induzida através da administração de carragenina (500 μ g/ml, i.p.). Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹, i.p.) foram administrados 1 hora antes e os animais sacrificados 4 horas após a indução da inflamação. Houve um aumento significativo na produção de MDA no lavado peritoneal nos grupos salina e PVP em relação ao grupo naive. O GSNO 2 mmol L⁻¹ reduziu significativamente os níveis de MDA no exsudato peritoneal quando comparado aos grupos salina e PVP. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.19 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratas

A carragenina promoveu edema na pata dos animais pertencentes aos grupos salina e PVP com pico na 3ª hora. A administração de GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o edema de pata induzido por carragenina quando comparado aos grupos salina e PVP (Figura 28).

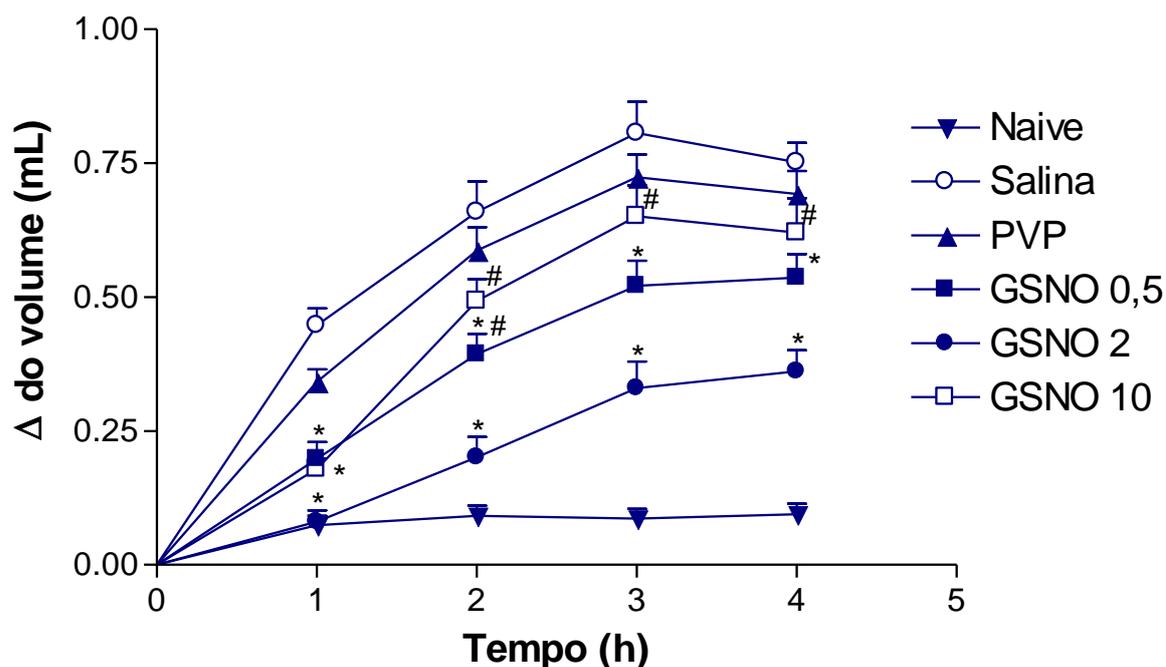


Figura 28: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratas.

Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) foi administrado 1 hora antes da indução do edema com carragenina (500μg/ml). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção do estímulo inflamatório ou salina. Os pontos das curvas representam a média ± EPM da variação do volume da pata de 6 animais por grupo. Todos os grupos foram estatisticamente diferentes do grupo naive, com exceção dos tempos 1 e 2h do grupo GSNO 2 mmol L⁻¹. *p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP. #p<0,05 em relação ao grupo GSNO 2 mmol L⁻¹.

4.20 Efeito do S-nitrosoglutathione (GSNO) sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido de pata de ratas após injeção de carragenina

A atividade de MPO mostrou-se significativamente aumentada ($p < 0,05$) na pata dos animais que receberam salina e PVP quando comparados aos animais normais (grupo naive). GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ preveniram o aumento da atividade de MPO na pata destes animais ($p < 0,05$) em relação aos grupos salina e PVP (Figura 29).

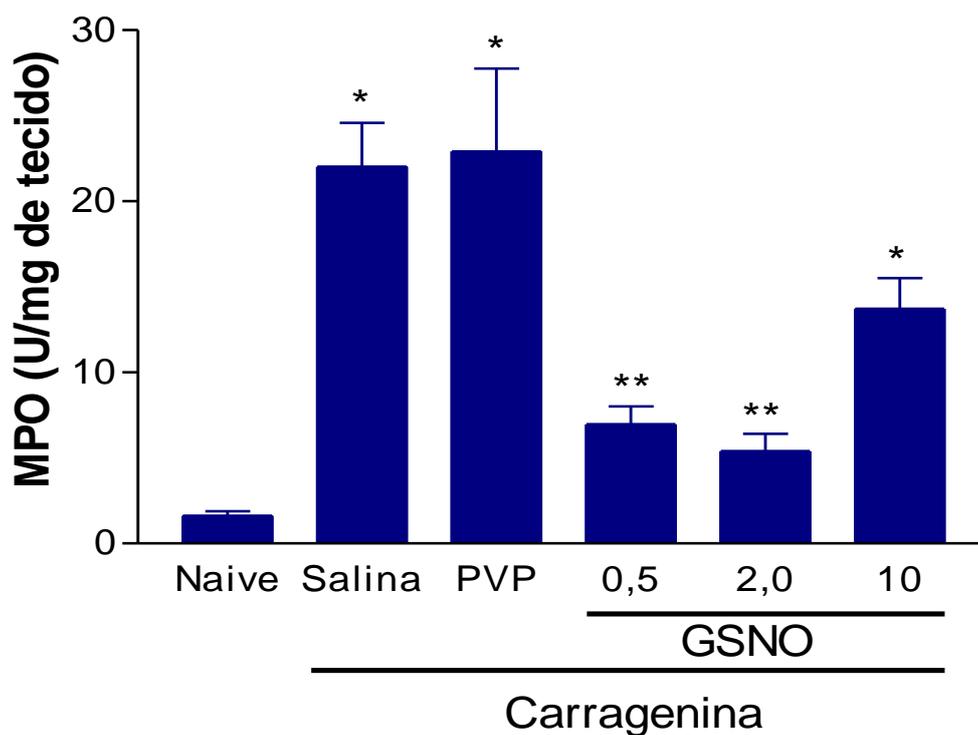


Figura 29: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido de pata de ratas após injeção de carragenina.

Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) foram administrados 1 hora antes da indução do edema de pata por carragenina (500µg/ml). Após 4 horas, os animais foram sacrificados e amostras de tecido das patas foram removidos para análise da atividade de MPO. Houve um aumento significativo na atividade da MPO nos grupos salina e PVP quando comparado ao grupo naive. GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ preveniram significativamente o aumento da atividade de MPO induzido por carragenina no tecido da pata em relação aos animais pré-tratados com salina ou PVP. As barras representam média ± EPM de unidades de MPO/mg de tecido. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina ou PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.21 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de citocinas no tecido da pata de ratas em modelo de edema de pata induzido por carragenina

4.21.1 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no edema de pata induzido por carragenina

As ratas que receberam apenas salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ intraperitonealmente 1 hora antes da administração de carragenina subplantar apresentaram intensa produção de IL-1 β (p<0,05) quando comparadas aos animais que receberam somente salina na pata (naive). A administração de GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ promoveu uma significativa diminuição (p<0,05) da produção de IL-1 β induzida por carragenina na pata das ratas em relação aos grupos salina e PVP (Figura 30).

4.21.2 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no edema de pata induzido por carragenina

No edema de pata induzido por carragenina, observou-se um aumento significativo (p<0,05) na produção de TNF- α em todos os grupos que receberam o estímulo inflamatório quando comparados ao grupo naive. Todavia, o GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ foi capaz de reduzir significativamente (p<0,05) a quantidade desta citocina produzida em resposta a carragenina na pata dos animais em relação aos grupos salina e PVP (Figura 31).

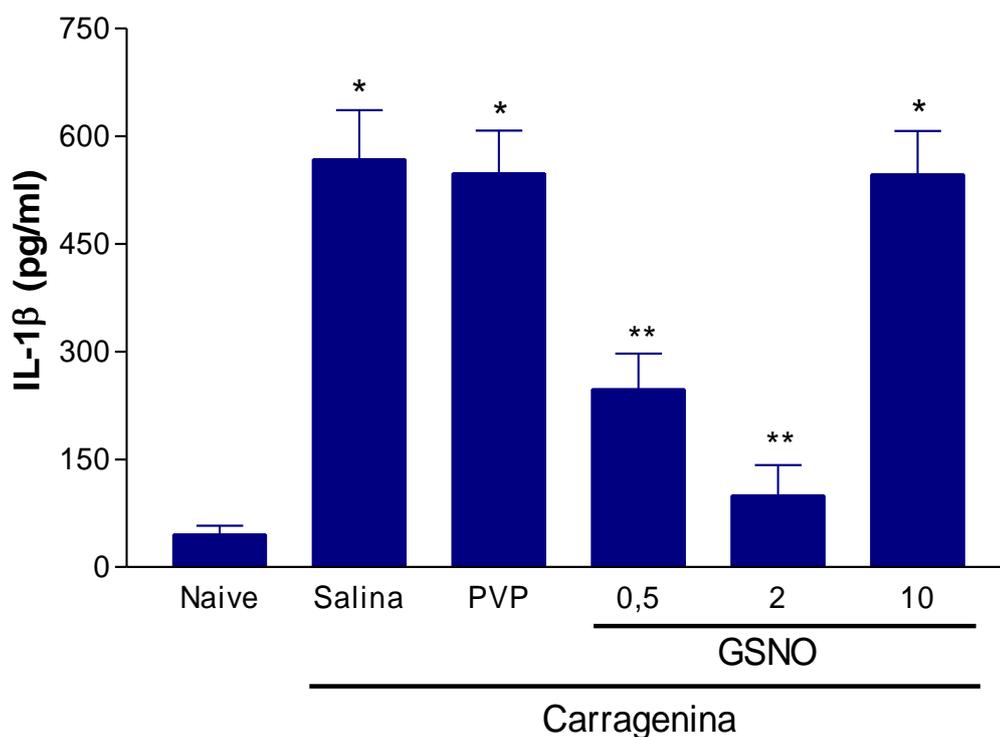


Figura 30: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de interleucina-1 beta (IL-1 β) no tecido de pata de ratas após injeção de carragenina.

As ratas que receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) 1 hora antes da administração de carragenina subplantar (500 μ g/ml), sendo sacrificadas 4 horas após a mesma. O pré-tratamento com GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ reduziu significativamente a produção de IL-1 β induzida pela carragenina na pata das ratas em relação aos animais que receberam salina ou PVP. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

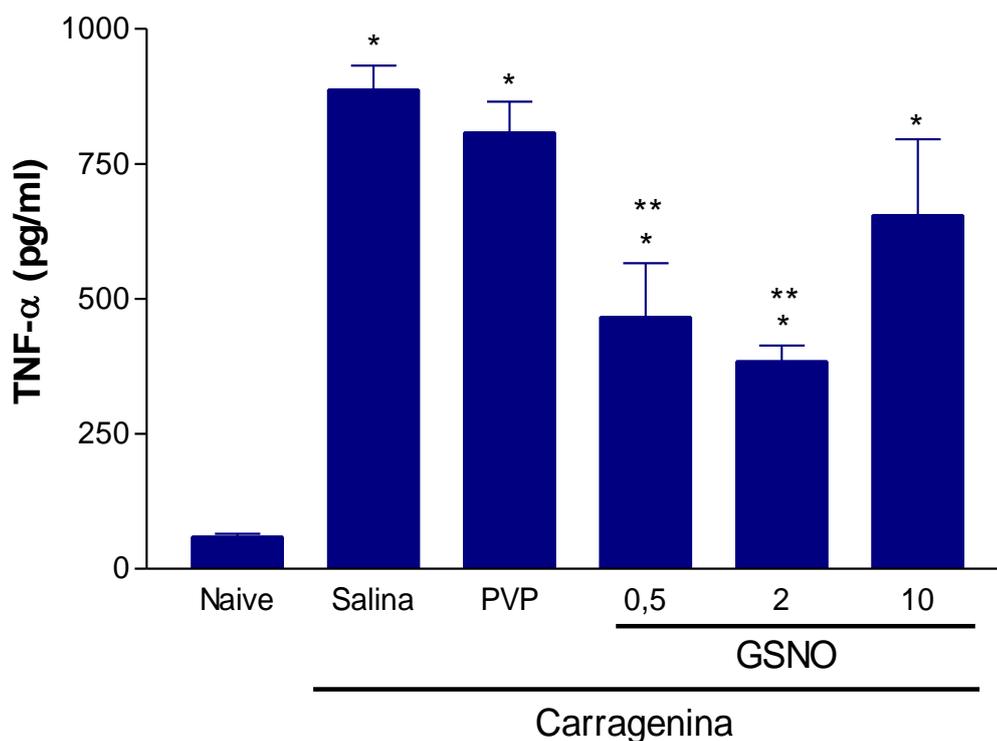


Figura 31: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no tecido de pata de ratas após injeção de carragenina.

Os animais receberam salina, PVP, GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) 1 hora antes da administração subplantar de carragenina (500 μ g/ml) e foram sacrificados 4 horas após a injeção do estímulo inflamatório. Todos os grupos cujos animais receberam carragenina subplantar apresentaram aumento significativo na produção de TNF- α quando comparados ao grupo naive. Contudo, os grupos GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ mostraram redução significativa da produção desta citocina induzida pela carragenina em relação aos grupos salina e PVP. As barras representam média \pm EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.22 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no tecido da pata de animais após injeção de carragenina

No tecido da pata injetado com carragenina, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da produção de nitrito/nitrato (NOx) nos grupos pré-tratados com salina ou PVP em relação ao grupo naïve. Os animais nos quais foi administrado GSNO 2 mmol L^{-1} apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração de NOx quando comparados aos animais pertencentes aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L^{-1} (Figura 32).

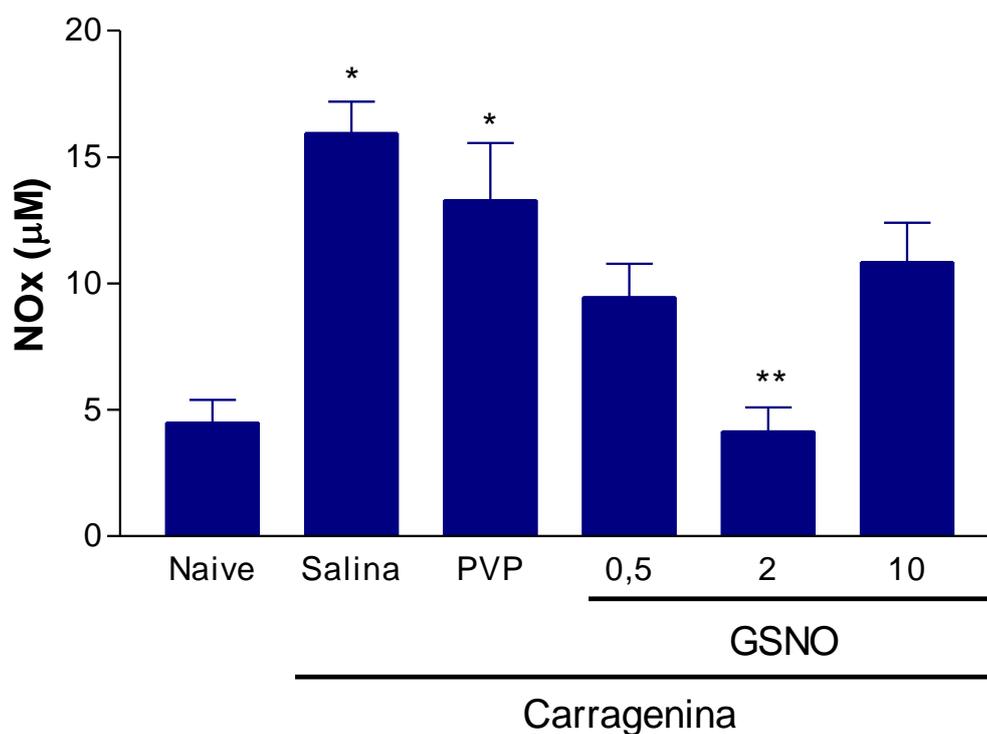


Figura 32: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NOx) no tecido da pata de ratas que receberam carragenina. Salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹) foram administrados 1 hora antes da administração subplantar de carragenina (500µg/ml). Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório. GSNO 2 mmol L⁻¹ foi capaz de reduzir a concentração de NOx induzido por carragenina no tecido da pata do animal a nível comparável ao grupo naive. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

4.23 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em tecido de pata de ratas que receberam carragenina

Os níveis de GSH mostraram-se significativamente reduzidos ($p < 0,05$) na pata dos animais que receberam carragenina e foram pré-tratados com salina, PVP ou GSNO 10 mmol L^{-1} quando comparados aos animais que receberam apenas salina na pata (grupo naive). No grupo GSNO 2 mmol L^{-1} , observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de GSH no tecido da pata destes animais quando comparado aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L^{-1} (Figura 33).

4.24 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em tecido de pata de animais após injeção de carragenina

Observou-se que nos grupos de animais tratados com salina, PVP, GSNO $0,5$ e 10 mmol L^{-1} , houve um aumento significativo dos níveis de MDA ($p < 0,05$) na pata dos animais em relação ao grupo naive. O GSNO 2 mmol L^{-1} reduziu significativamente os níveis de MDA induzido por carragenina ($p < 0,05$) no tecido da pata das ratas quando comparado aos grupos salina e PVP (Figura 34).

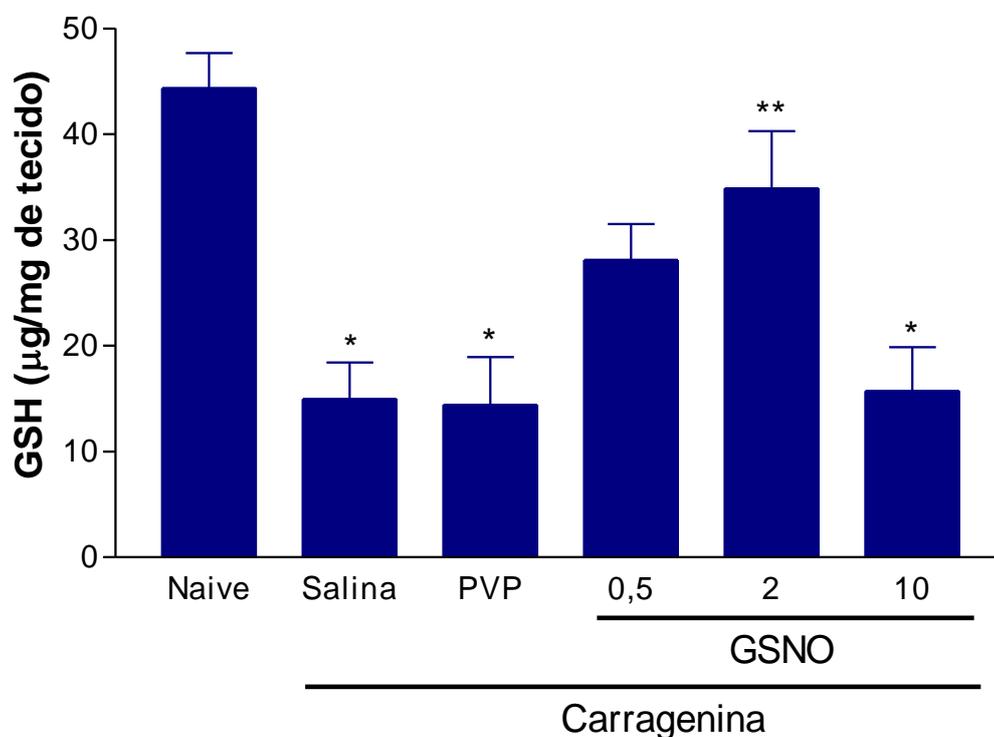


Figura 33: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de glutatona reduzida (GSH) no tecido da pata de ratas que receberam carragenina.

As ratas receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) 1 hora antes da administração subplantar de carragenina (500µg/ml), sendo sacrificadas 4 horas após a mesma. Nos animais que receberam carragenina e foram pré-tratados com salina, PVP ou GSNO 10 mM, houve uma diminuição dos níveis de GSH. O GSNO 2 mmol L⁻¹ foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GSH no tecido da pata do animal. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ (ANOVA, Bonferroni).

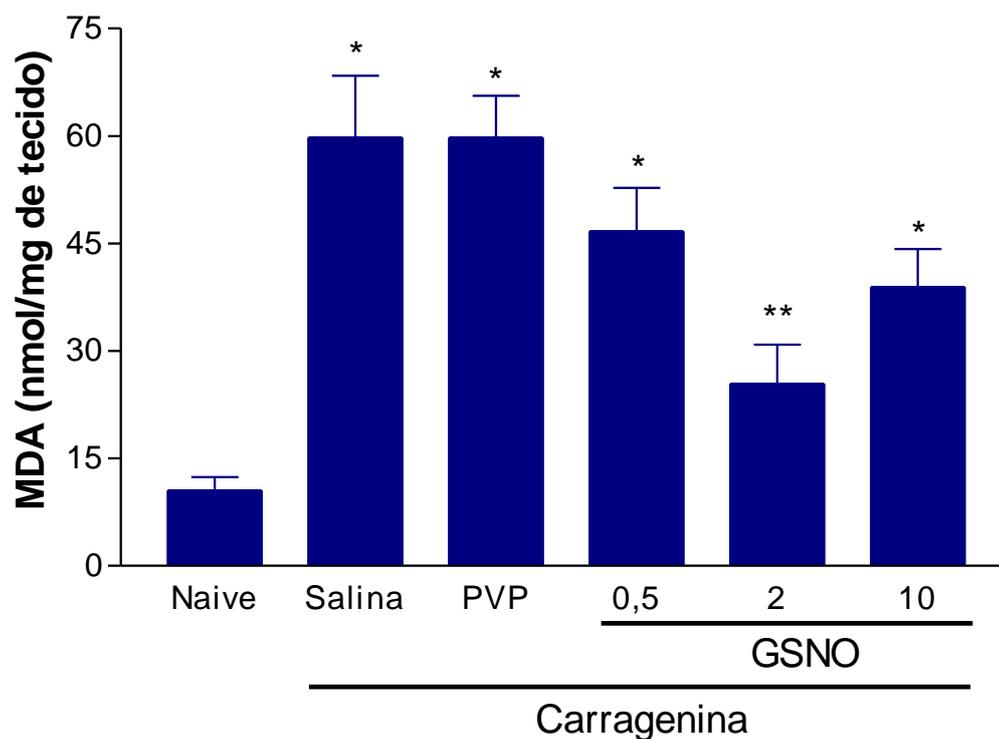
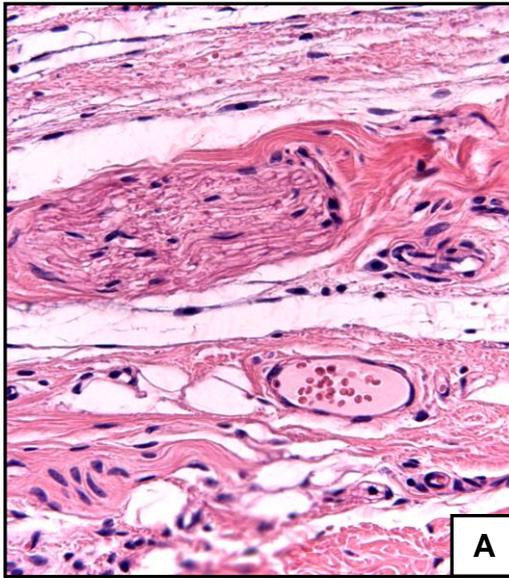


Figura 34: Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre a produção de malondialdeído (MDA) no tecido da pata de ratas após injeção de carragenina.

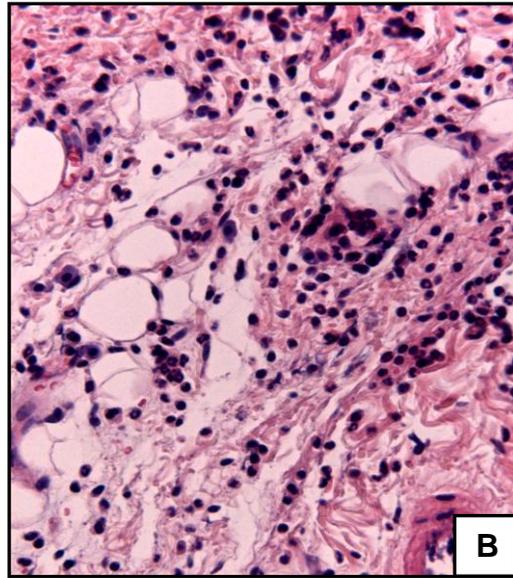
As ratas que receberam salina, PVP ou GSNO (0,5, 2 ou 10 mmol L⁻¹; i.p.) 1 hora antes da administração de carragenina subplantar (500µg/ml), sendo sacrificadas 4 horas após a mesma. GSNO 2 mmol L⁻¹ foi capaz de diminuir significativamente os níveis de MDA induzido por carragenina no tecido da pata das ratas em relação aos animais que receberam salina ou PVP. As barras representam média ± EPM de, no mínimo, cinco animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo naive. **p<0,05 em relação aos grupos salina e PVP (ANOVA, Bonferroni).

4.25 Efeito do S-nitrosoglutationa (GSNO) sobre as alterações histopatológicas observadas no tecido da pata de animais que receberam carragenina subplantar

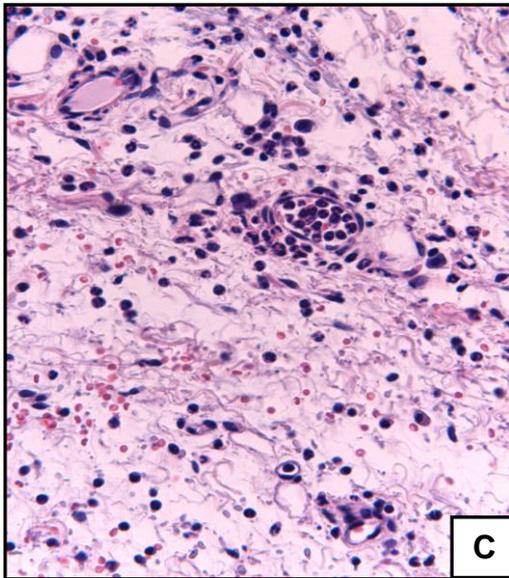
A análise histopatológica das patas das ratas nas quais foram administradas carragenina subplantar e que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L^{-1} (Figura 35B, 35C e 35F, respectivamente), mostrou presença de acentuado infiltrado celular inflamatório e edema intersticial. Estes achados não foram encontrados nos animais que receberam somente salina na pata (naive) (Figura 35A). As patas dos animais pré-tratados com GSNO $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, apresentou uma certa diminuição do infiltrado celular mas com a permanência do edema intersticial (Figura 35D). Nos animais tratados com GSNO 2 mmol L^{-1} não foi observado infiltrado de células inflamatórias nem edema intersticial (Figura 35E).



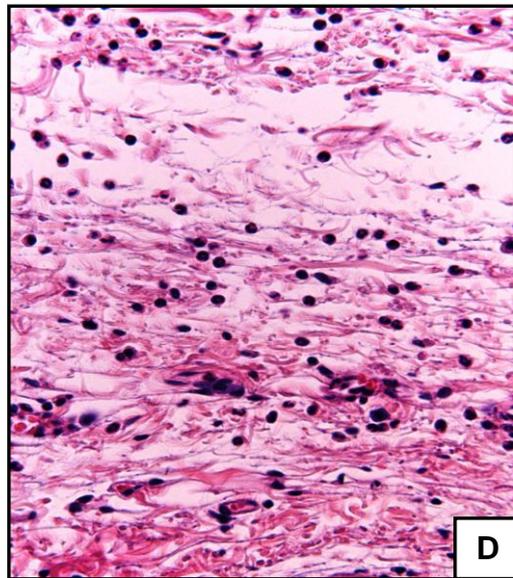
Naive



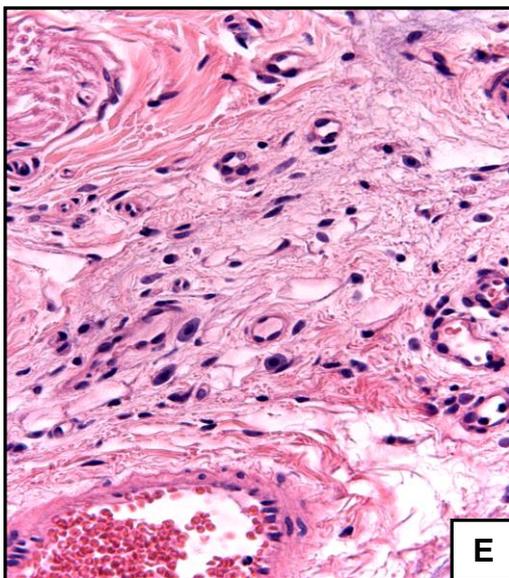
DPE



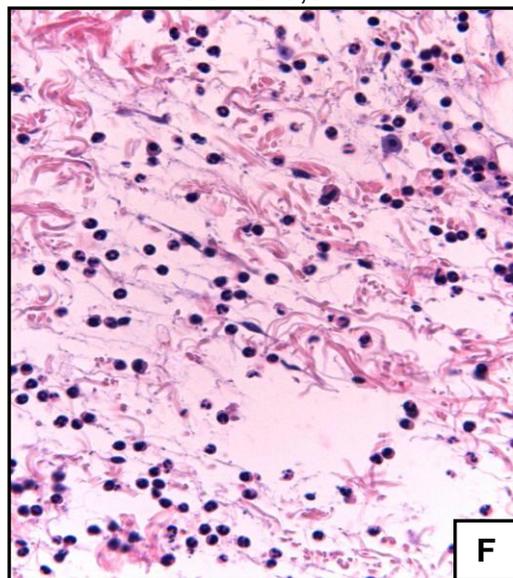
PVP



GSNO 0,5



GSNO 2



GSNO 10

Figura 35: Fotomicrografias do tecido da pata de animal normal e de ratas que receberam carragenina subplantar e tratados com salina, PVP ou GSNO.

As ratas que receberam salina, PVP ou GSNO ($0,5$, 2 ou 10 mmol L^{-1} ; i.p.) 1 hora antes da administração de carragenina subplantar ($500\mu\text{g/ml}$), sendo sacrificadas 4 horas após a mesma. O tecido da pata traseira foi removido e processado para coloração pelo método de HE. **A.** Região plantar de animal que recebeu apenas salina. **B.** Região plantar de animal que recebeu carragenina e que foi tratado com salina, apresentando presença de intenso infiltrado celular inflamatório e edema intersticial. **C.** Região plantar de animal com edema induzido por carragenina ao qual foi administrado PVP, mostrando características iguais ao anterior. **D.** Região plantar de animal no qual foi administrado carragenina e GSNO $0,5$ mmol L^{-1} , onde se observa diminuição parcial do infiltrado inflamatório e presença do edema intersticial. **E.** Região plantar de animal que recebeu carragenina e tratado com GSNO 2 mmol L^{-1} , mostrando ausência de infiltrado celular inflamatório e de edema. **F.** Região plantar de animal com edema induzido por carragenina ao qual foi administrado GSNO 10 mmol L^{-1} , apresentando intenso infiltrado inflamatório e edema intersticial. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento 400x.

5 DISCUSSÃO

As doenças periodontais são consideradas a maior causa de perda dentária em adultos (PIHLSTROM *et al.*, 2005; PANJAMURTHY *et al.*, 2005; MATTHEWS *et al.*, 2006). Esta doença ocorre em pessoas predispostas, as quais possuem uma resposta imune-inflamatória alterada diante da placa microbiana que se acumula ao redor da margem gengival (CHAPPLE *et al.*, 2002).

A doença periodontal tem sido tradicionalmente tratada por procedimentos mecânicos, tais como raspagem e alisamento radicular, associados ou não a procedimentos cirúrgicos, a fim de descontaminar a superfície radicular. No entanto, apesar da terapia periodontal mecânica trazer bons resultados na maioria dos casos, podem ocorrer resultados insatisfatórios, devido a persistência ou recrescimento de certos microrganismos em locais tratados. Neste caso, o uso de antimicrobianos sistêmicos pode ser de grande valia (GOLUB *et al.*, 1998; MOMBELLI, 1999; SALLUM *et al.*, 2002). Com o conhecimento de que a resposta do hospedeiro é fundamental para a ocorrência da doença, também se pode lançar mão de fármacos capazes de modular esta resposta, tais como antiinflamatórios não-esteroidais e bisfosfonatos (GOLUB *et al.*, 1998; PAQUETTE; WILLIAMS, 2000; MENEZES *et al.*, 2005; AZOUBEL *et al.*, 2007).

No presente estudo, buscou-se verificar o efeito do tratamento com o S-nitrosoglutationa (GSNO) bem como elucidar os mecanismos pelos quais essa substância atua na periodontite em modelo animal. Para tal, a doença periodontal foi induzida através da inserção de fio de náilon 3.0 ao redor dos segundos molares superiores esquerdos de ratas Wistar, de acordo com modelo desenvolvido por vários autores (CRAWFORD *et al.*, 1978; SALLAY *et al.*, 1982; SAMEJIMA *et al.*, 1990; KOIDE *et al.*, 1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA (LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2005). A ligadura age tanto por trauma mecânico como sendo um fator promotor da formação do biofilme dental na região gengival (SALLAY *et al.*, 1982; MENEZES *et al.*, 2005).

A estrutura e a organização do tecido periodontal da região de molares em ratos, incluindo epitélio gengival oral, epitélio sulcular oral, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento celular e acelular e osso alveolar, são muito semelhantes as do ser humano. A maior diferença consiste no fato de que o epitélio sulcular gengival dos ratos é queratinizado. Porém, estudos mostram que não se deve pensar que a barreira funcional gengival é diferente nos ratos e nos seres

humanos, embora a extensão da área afetada seja maior no homem (KLAUSEN, 1991). Dessa forma, o modelo aqui utilizado foi capaz de reproduzir as principais características encontradas na periodontite em humanos, sendo apropriado para o estudo dessa doença (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000).

Neste trabalho, de forma semelhante a estudos anteriores (LIMA *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005), observou-se uma significativa perda óssea alveolar no 11º dia após a indução da doença periodontal experimental (DPE), a qual foi avaliada através do índice de perda óssea (IPO) e da análise histopatológica.

A administração de GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 e 100 nmol, respectivamente) reduziu de forma significativa o índice de perda óssea (IPO) na doença periodontal experimental. Nossos achados estão de acordo com Percival *et al.* (1999) os quais mostraram que o GSNO possui efeito inibitório na reabsorção óssea, o qual pode ocorrer através da inibição da atividade da catepsina K purificada, bem como do impedimento da maturação autocatalítica da procatepsina K em catepsina K *in vitro*. A catepsina K é uma enzima altamente expressa nos osteoclastos e, devido sua localização, possui um papel chave na reabsorção óssea. Considerando que o GSNO é um doador de NO, ele também poderia estar atuando através desse radical livre no tecido ósseo periodontal. O NO possui um efeito bifásico na atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, podendo ter um efeito estimulatório ou inibitório na remodelação óssea, dependendo dos níveis de NO e do modelo utilizado (ALAYAN *et al.*, 2006). Assim, corroborando com nossos achados, Leitão *et al.* (2004), em nosso laboratório, mostraram que o uso de um gel contendo isosorbida, um doador de NO, administrado localmente na doença periodontal experimental foi capaz de diminuir a perda óssea alveolar. Kasten *et al.* (1994) também relatou que o nitroprussiato de sódio (SNP), outro doador de NO, inibiu a reabsorção óssea *in vitro* e que o uso de inibidores da NOS (L-NAME e aminoguanidina), aumentou a atividade reabsortiva também *in vitro* (KASTEN *et al.*, 1994; RALSTON *et al.*, 1995; BRUNE *et al.*, 1998).

Entretanto, quando foi administrado GSNO na concentração de 10 mmol L⁻¹ (dose de 500 nmol), não ocorreu inibição da reabsorção óssea, mostrando que o GSNO em altas concentrações não inibe a atividade reabsortiva. De acordo com Uğar-Çankal e Ozmeric (2006), níveis excessivos da produção de NO pode levar à destruição tecidual na periodontite. Contudo, este efeito é contraditório com alguns

estudos que mostram que o NO em altas concentrações suprimem a formação e a atividade dos osteoclastos, inibindo, com isso, a reabsorção óssea (RALSTON *et al.*, 1995; KENDALL *et al.*, 2001; MACINTYRE *et al.*, 1991). Essa contradição possivelmente está relacionada com o tipo de experimento utilizado, em que a reabsorção óssea foi estudada em culturas de órgãos e células (MACINTYRE *et al.*, 1991; RALSTON *et al.*, 1995).

Os dados obtidos no nosso trabalho em relação ao IPO foram confirmados através da dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea, a qual é um marcador da atividade osteoblástica. Este parâmetro deve ser valorizado considerando que quando há uma diminuição da fosfatase alcalina óssea (FAO) no ligamento periodontal, também é esperada uma redução da enzima a nível sérico (GILBERT *et al.*, 2003). Os grupos que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ apresentaram baixos níveis desta enzima. Gilbert *et al.* (2003) mostraram que a dosagem da fosfatase alcalina óssea no soro de pacientes com doença periodontal foi menor quando comparado com pacientes saudáveis. No nosso caso, não tivemos diminuição da FAO nos animais com DPE, porém estes níveis ficaram semelhantes aos dos animais naive. A dosagem de FAO pode ser utilizada como um marcador da atividade da doença ou como parâmetro de resposta ao tratamento instituído (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002). Observamos que GSNO na concentração de 2 mmol L⁻¹ induziu um aumento da produção desta enzima no 11º dia de tratamento, corroborando com a diminuição da perda óssea nesta concentração ou, até mesmo, com a promoção de nova formação óssea. De acordo com Keles *et al.* (2005), altos níveis séricos de FAO na periodontite experimental estão associados com aumento da formação óssea.

Considerando a análise histopatológica, o periodonto de animais submetidos à DPE e que receberam apenas salina ou PVP apresentou intenso infiltrado celular inflamatório no 11º dia após a cirurgia, além de destruição total do processo alveolar e destruição acentuada do cemento, achados que conferem com os estudos de Lima *et al.* (2000) e Leitão *et al.* (2004). Observamos que os animais que receberam GSNO nas concentrações de 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 ou 100 nmol, respectivamente) mostraram diminuição do infiltrado celular inflamatório e preservação do processo alveolar e cemento radicular, mostrando que nestas concentrações o GSNO possui efeito antiinflamatório, com conseqüente proteção do

cimento e do osso alveolar. Corroborando os achados supracitados, Leitão *et al.* (2004) mostraram que a isosorbida, um doador de NO, diminuiu o infiltrado celular inflamatório e preservou o cimento e o osso alveolar quando comparado ao grupo com periodontite. Contudo, o GSNO na concentração de 10 mmol L^{-1} (dose de 500 nmol) não apresentou efeito protetor na análise histopatológica.

Resultados semelhantes foram obtidos na análise histológica da pata de animais em modelo de edema de pata induzidos por carragenina. Observou-se no grupo GSNO $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (dose de $0,5 \text{ } \mu\text{mol}$) uma diminuição do infiltrado celular inflamatório, porém ainda com edema intersticial e no grupo GSNO 2 mmol L^{-1} (dose de $2 \text{ } \mu\text{mol}$) ausência de infiltrado celular inflamatório e edema. Estes dados confirmam a atividade antiinflamatória do GSNO nesta concentração. Vale ressaltar que alguns estudos mostram que o GSNO suprime a expressão de moléculas de adesão endoteliais, através da inibição do fator de transcrição NF- κ B e da produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorrendo, com isso, a inibição da infiltração leucocitária (PAVLICK *et al.*, 2002; SAVIDGE *et al.*, 2007).

Também foi mostrada através da coloração com Tricrômio de Mallory, uma acentuada destruição das fibras colágenas nos grupos que receberam salina ou PVP. Segundo Keles *et al.* (2005), durante a progressão da doença periodontal, ocorre destruição de fibras colágenas, surgindo espaços os quais vão sendo ocupados por células inflamatórias e tecido conjuntivo frouxo periodontal. O GSNO nas concentrações de $0,5$ e 2 mmol L^{-1} (dose de 25 e 100 nmol, respectivamente) preservou parcialmente as fibras colágenas do ligamento periodontal. No entanto, o GSNO na concentração de 10 mmol L^{-1} (dose de 500 nmol) apresentou-se semelhante ao grupo salina e PVP, isto é, com destruição significativa das fibras colágenas. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores os quais mostraram que os efeitos biológicos do NO são altamente dependente de sua concentração. Em baixas concentrações de NO, ocorre um aumento da síntese de colágeno; enquanto que em altas concentrações de NO, ocorre um aumento da formação de coágulo e prejuízo na organização do colágeno, contribuindo para uma reação tecidual adversa durante a cicatrização (BAUER *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2001). Outrossim, segundo Achuth *et al.* (2005), o GSNO aumenta a deposição de colágeno em cicatrização de feridas cutâneas, que pode ser consequência do aumento da síntese de colágeno, do aumento da proliferação dos fibroblastos ou de

ambos. Amadeu *et al.* (2008) também mostrou que o GSNO tópico, principalmente quando aplicado em feridas cutâneas de ratos nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização, aumenta a quantidade de fibroblastos bem como a deposição de colágeno.

A fim de confirmar os dados obtidos anteriormente, foi realizada imunohistoquímica para a marcação da metaloproteinase-1/-8 (MMP-1/-8). É importante lembrar que a MMP-1 (tipo fibroblasto) e a MMP-8 (tipo neutrofílico), juntamente com MMP-13 e MMP-18 constituem o grupo de metaloproteinases denominado de colagenases (DAHAN *et al.*, 2001). Segundo Golub *et al.* (2008), a MMP-8 compreende 80% do total das colagenases encontradas no fluido gengival crevicular com quantidades bem menores de MMP-13 e MMP-1 (nesta ordem) em pacientes com periodontite crônica. Em nosso estudo, os animais com DPE nos quais foram administrados salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹ (dose de 500 nmol) apresentaram grande quantidade de células do periodonto imunomarcadas para MMP-1/-8, mostrando que no tecido gengival inflamado, os níveis destas colagenases estão aumentados. Estudos mostram que elevados níveis de MMP-8 têm sido encontrados na saliva, bolsa periodontal ou plasma de pacientes com periodontite quando comparados com pessoas periodontalmente saudáveis e que esses níveis diminuem após terapia periodontal (KINANE *et al.*, 2003; RAI *et al.*, 2008; MARCACCINI *et al.*, 2010). Além disso, Kinane *et al.* (2003) sugeriram que a MMP-8 é um bom marcador para a detecção de sítios periodontais em pacientes com doença ativa. De acordo com Uğar-Çankal e Ozmeric (2006), a ativação e a expressão das MMPs que participam da doença periodontal podem ser mediadas pelo NO. Nos tecidos periodontais, níveis aumentados da produção de NO através da enzima NOSi leva à ativação das MMPs promovendo, com isso, a destruição tecidual que ocorre na periodontite (UĞAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006).

Nos animais que receberam GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 ou 100 nmol, respectivamente), houve uma acentuada redução da marcação para as colagenases MMP-8, demonstrando que nestas concentrações o GSNO foi capaz de inibir a expressão desta enzima, o que pode estar relacionado com a diminuição da infiltração neutrofílica do GSNO visto na análise histopatológica e na dosagem de MPO. Khan *et al.* (2009) mostraram que o GSNO foi capaz de inibir a expressão de MMP-9 na isquemia focal cerebral em ratos. Achuth *et al.* (2005) também mostraram

que o GSNO inibe a atividade de MMP nas plaquetas, inibindo a agregação plaquetária. Outrossim, Okamoto *et al.* (2002) demonstrou que a expressão da MMP-9 em células epiteliais brônquicas foi inibida pelos S-nitrosotióis GSNO e SNAP, e que este efeito foi associado com a diminuição da ativação e translocação nuclear de NF- κ B. Todos esses trabalhos mostram o efeito inibitório do GSNO sobre as MMPs, corroborando, assim, nossos dados.

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro e, pela sua habilidade em fagocitar microrganismos, eles podem proteger o organismo de infecções. Contudo, essas células podem produzir mediadores inflamatórios promovendo uma auto-amplificação do recrutamento e da ativação dos PMNs, amplificando e perpetuando a resposta inflamatória e a destruição tecidual. Além disso, os neutrófilos ativados liberam radicais de oxigênio e enzimas proteolíticas, os quais também podem induzir o dano tecidual (VAN DYKE; SERHAN, 2003).

Considerando que a MPO é um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido e que ela tem sido apontada como um indicador da patogênese periodontal (MIYASAKI *et al.*, 1997; ÖVER *et al.*, 1993), esta enzima foi dosada na gengiva dos animais submetidos à DPE. Houve um aumento significativo da atividade de MPO nos grupos de animais com DPE e tratados com salina ou PVP em relação ao grupo naive. Dados do nosso grupo neste modelo animal mostraram que a atividade da MPO após 6 horas da indução da doença periodontal experimental encontrava-se aumentada na gengiva de ratos, confirmando os resultados encontrados (MENEZES *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores também mostraram que a atividade da MPO apresenta-se aumentada tanto no fluido gengival como na gengiva de pacientes com doença periodontal e que a atividade desta enzima diminuiu significativamente após terapia periodontal (ÖVER *et al.*, 1993; BORGES JR *et al.*, 2007; MARCACCINI *et al.*, 2010). Os animais nos quais foram administrados GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 ou 100 nmol, respectivamente) apresentaram uma redução significativa da atividade de MPO no tecido gengival, enquanto que a administração de GSNO 10 mmol L⁻¹ (dose de 500 nmol) não reduziu a atividade desta enzima. Estes dados estão de acordo com MA *et al.* (1999) que mostraram que o GSNO diminuiu significativamente a atividade da MPO em tecidos miocárdicos isquêmicos não-necróticos e necróticos em modelo de isquemia miocárdica regional.

Todavia, dependendo da concentração empregada, compostos doadores de NO, como GSNO, podem estimular a ativação dos neutrófilos (ANDONEGUI *et al.*, 1995).

Resultados semelhantes foram encontrados nos modelos de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina, nos quais os animais tratados com salina ou PVP apresentaram elevada atividade de MPO no exsudato peritoneal e na pata em relação aos animais normais. Salvemini *et al.* (1996) demonstraram que seis horas após a injeção de carragenina na pata de animais, foi observado um aumento no volume da mesma o qual estaria associado com a infiltração neutrofílica, sendo esta mensurada pelo aumento da atividade de MPO no tecido da pata. O GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ (doses de 0,5 e 2 µmol, respectivamente) foi capaz de reduzir significativamente a atividade desta enzima tanto na pata como no peritônio dos animais que receberam o estímulo inflamatório carragenina, confirmando, a atividade antiinflamatória do GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ nestes dois modelos experimentais, corroborando os dados obtidos na fase aguda da DPE (6 horas).

Vale ressaltar que as reações inflamatórias induzidas por carragenina em ratos são consideradas modelos convencionais para o estudo de drogas antiinflamatórias (DAMAS *et al.*, 1990). No modelo de peritonite, observou-se que o pré-tratamento com salina, PVP e GSNO 10 mmol L⁻¹ não inibiu a infiltração neutrofílica induzida por carragenina na cavidade peritoneal. Os animais pré-tratados com GSNO 0,5 e 2 mmol L⁻¹ (dose de 5 e 20 µmol, respectivamente), entretanto, apresentaram uma redução significativa do número de neutrófilos no exsudato peritoneal, o que está de acordo com os dados obtidos quando da análise da MPO no modelo de edema de pata, bem como no modelo de doença periodontal, o que evidencia a atividade dose-dependente do GSNO como agente antiinflamatório. De acordo com nossos dados, Leite *et al.* (2009) mostraram que o NO diminuiu o recrutamento dos neutrófilos na peritonite, sendo este efeito mediado por mecanismos dependente da guanilato ciclase. Andonegui *et al.* (2009) mostraram que o NO, além de inibir a função dos neutrófilos, também inibe a aderência, a quimiotaxia, a agregação e a síntese de leucotrieno B4 (LTB4).

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo útil para analisar a contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas com a inflamação aguda. A resposta inflamatória aguda é caracterizada pelo aumento da

permeabilidade vascular e da infiltração celular, resultando em extravasamento de fluido e proteínas e no acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, no sítio inflamatório, levando à formação de edema. A fase inicial do edema tem sido atribuída à liberação de histamina e bradicinina, enquanto a fase posterior tem sido relacionada à produção elevada de prostaglandinas em resposta a citocinas pró-inflamatórias. A infiltração e a ativação dos neutrófilos também contribuem para esta resposta inflamatória (SALVEMINI *et al.*, 1996; POSADAS *et al.*, 2004).

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, mostramos que salina e PVP não inibiram o edema induzido por este estímulo inflamatório, que seguiu seu curso normal com pico na 3ª hora, conforme Carvalho *et al.* (2006). O GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ foi capaz de diminuir este edema, confirmando o efeito antiinflamatório do GSNO. Contudo, na maior concentração, o GSNO não apresentou efeito antiinflamatório.

A periodontite é uma doença crônica inflamatória, na qual ocorre perda óssea localizada e destruição tecidual mediados por citocinas e mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 e prostaglandinas (KENDALL *et al.*, 2001; OATES *et al.*, 2002). Em nosso estudo, demonstramos que a concentração de IL-1 β e TNF- α no tecido gengival de animais com DPE e pré-tratados com salina ou PVP está bastante aumentada. Estudos anteriores mostraram que, na doença periodontal, há um aumento da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β), a qual pode ser produzida por diferentes células, tais como monócitos, macrófagos e, também, por neutrófilos (KJELDSEN *et al.*, 1995; MILLER *et al.*, 1996; BOCH *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003). Dados do nosso laboratório demonstraram previamente que inibidores da síntese de citocinas como a pentoxifilina e, em particular, inibidores da síntese de TNF- α (talidomida e clorpromazina) reduziram a destruição tecidual e a perda óssea na doença periodontal experimental, chamando a atenção para a importância de citocinas na patogênese da DPE (LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004).

O tratamento com GSNO nas menores concentrações diminuiu significativamente a quantidade de IL-1 β e TNF- α na gengiva dos animais. Tanto no modelo de peritonite como no de edema de pata foram encontrados resultados semelhantes aos da DPE, mostrando que o GSNO nas concentrações de 0,5 e 2 mmol L⁻¹ (doses de 0,5 e 2 μ mol) reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). Em contrapartida, a maior concentração do GSNO não preveniu o

aumento dessas citocinas nos modelos testados. Sabe-se que estas citocinas estão envolvidas na migração de células inflamatórias, inclusive neutrófilos e monócitos, estando, portanto, relacionadas com a destruição tecidual.

Considerando ainda que citocinas são indutores da transcrição de NOSi, analisamos a expressão de NOSi no tecido periodontal através de imunohistoquímica. Observou-se que a expressão de NOSi, enzima que sintetiza altas concentrações de NO sob condições inflamatórias, está aumentada nos animais com DPE, o que não foi revertido com o tratamento com salina ou PVP. Esses achados estão de acordo com outros estudos que mostraram que a atividade de NOSi e a síntese de NO estão aumentadas nos tecidos periodontais inflamados (LOHINAI *et al.*, 1998; LAPPIN *et al.*, 2000; KENDALL *et al.*, 2001; POPKOV *et al.*, 2005; UĞAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006; REHER *et al.*, 2007). Batista *et al.* (2002) mostraram que a análise imunohistoquímica em tecido gengival de pacientes com doença periodontal apresentou um significativo aumento do número de células positivas para NOSi em relação ao tecido gengival de pacientes saudáveis e que estas células foram predominantemente PMNs. No nosso estudo observamos marcação de PMNs, mononucleares e osteoclastos nos animais com DPE e tratados com salina ou PVP. A imunohistoquímica realizada no periodonto de animais tratados com GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 ou 100 nmol, respectivamente), demonstrou redução considerável da marcação para NOSi. Contudo, observou-se uma intensa imunomarcação no tecido periodontal dos animais pertencentes ao grupo GSNO 10 mmol L⁻¹ (dose de 500 nmol), semelhante aos resultados obtidos nos grupos salina e PVP.

Diante do exposto, observamos nos grupos tratados com GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ uma diminuição tanto dos níveis teciduais das citocinas IL-1 β e TNF- α como da imunomarcação para NOSi, sugerindo, mais uma vez, um efeito antiinflamatório do GSNO nas menores concentrações. Estes achados estão de acordo com Khan *et al.* (2005) que mostraram que o GSNO inibiu a expressão de IL-1 β , TNF- α e NOSi, bem como reduziu a morte celular por apoptose através da inibição da caspase-3 em modelo de AVC em ratos. Além disso, o tratamento com GSNO *in vitro* inibiu a expressão de citocinas e/ou NOSi induzida por LPS. Em um outro artigo, Khan *et al.* (2009), mostra que a diminuição de NOSi por GSNO é

mediada pela inibição da ativação de NF- κ B em astrócitos primários de ratos e células microgliais.

De acordo com estes resultados, dados apresentados neste trabalho mostram que o GSNO na concentração de 2 mmol L⁻¹ (dose de 100 nmol) reduziu a imunomarcação para a fração dissociada p50 NLS do fator de transcrição NF- κ B nas gengivas dos animais. Este efeito pode explicar, pelo menos em parte, a ação do GSNO 2 mmol L⁻¹ na inibição da síntese de citocinas e na expressão de NOSi encontradas neste trabalho.

De acordo com Khan *et al.* (2005), 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.

A dosagem de nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico e da ativação da NOSi. Corroborando com os dados acima obtidos, observamos que na doença periodontal experimental houve um aumento significativo da quantidade de nitrito/nitrato (NOx) em todos os grupos submetidos à DPE. Similarmente, Popkov *et al.* (2005) mostrou que a concentração dos metabólitos nitrito e nitrato estavam aumentados no soro de ratos submetidos à periodontite experimental, proporcionalmente ao aumento da atividade de NOSi. A administração de GSNO 0,5 ou 2 mmol L⁻¹ (doses de 25 ou 100 nmol) nos animais diminuiu a concentração de NOx na gengiva em relação ao grupo salina e PVP, o que deve estar diretamente relacionado com a diminuição da expressão de NOSi constatada pela imunohistoquímica.

De forma semelhante, também foi observado nos estudos de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina um aumento da concentração de NOx no grupo de animais submetidos ao estímulo inflamatório carragenina e que receberam salina, PVP ou GSNO 10 mmol L⁻¹. Esses resultados estão de acordo com dados obtidos por Salvemini *et al.* (1996), que observaram que o edema de pata provocado pela carragenina estava associado com a produção elevada de NO₂⁻/NO₃⁻ no tecido

da pata. Nos modelos de inflamação aguda, somente o GSNO na concentração de 2 mmol L⁻¹ foi capaz de diminuir de forma significativa a quantidade de NOx.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão implicadas na destruição dos tecidos durante a doença periodontal inflamatória, sendo o estresse oxidativo um importante fator da patogênese da periodontite. Diferentes mecanismos podem causar o dano tecidual através das ROS, incluindo dano ao DNA, peroxidação lipídica, dano protéico, oxidação enzimática e estimulação de citocinas inflamatórias (GRANT *et al.*, 2010).

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).

Neste estudo, observamos baixos níveis de GSH nos animais com DPE e que receberam salina ou PVP. Estes achados estão de acordo com vários trabalhos que mostram que a concentração de GSH é menor tanto no soro como no fluido gengival de pacientes com periodontite quando comparado com pessoas periodontalmente saudáveis (CHAPPLE *et al.*, 2002; PANJAMURTHY *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2005). Esses dados sugerem que grande quantidade de GSH foi consumida durante a geração das ROS, levando a uma deficiência deste antioxidante. Além disso, muitas bactérias na cavidade oral e na bolsa periodontal também podem consumir GSH. Vale ressaltar que pacientes com periodontite, possuem quantidades aumentadas de periodontopatógenos subgengivais. Esta microbiota metaboliza a GSH, promovendo a redução dos níveis deste antioxidante na saliva e/ou no fluido crevicular gengival (TSAI *et al.*, 2005).

Aqui, observamos que o GSNO na concentração de 2 mmol L⁻¹ aumentou o nível de GSH no tecido gengival. Esses achados estão de acordo com Rauhala *et al.* (1998), os quais demonstraram que o GSNO é um potente antioxidante, o qual inibiu a geração de radicais hidroxil e a peroxidação de lipídios no cérebro. Ainda nesse trabalho, os autores observaram que o GSNO foi 100 vezes mais potente na supressão do estresse oxidativo quando comparado com a glutatona, sugerindo que a propriedade antioxidativa do GSNO deve ser mediada pelo NO. Contudo, nas concentrações de 0,5 e 10 mmol L⁻¹ a quantidade de GSH permaneceu baixa. Isso mostra que o efeito antioxidativo do GSNO é dependente da concentração.

Resultados semelhantes foram encontrados nos modelos de edema de pata e peritonite induzidos por carragenina, reforçando os dados obtidos na DPE.

Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA, $C_3H_4O_2$), podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (ANTUNES *et al.*, 2008). Nosso estudo mostrou que nos animais com DPE e tratados com salina ou PVP, houve um aumento na quantidade de MDA em relação ao grupo naive, implicando que o dano oxidativo nos tecidos está aumentado na inflamação periodontal. Tal resultado está de acordo com estudos anteriores que mostram que o conteúdo de MDA no fluido crevicular gengival e na saliva de pacientes com periodontite crônica apresenta-se elevado em relação a pacientes periodontalmente saudáveis (TSAI *et al.*, 2005; CANAKCI *et al.*, 2009). O GSNO na concentração de 2 mmol L^{-1} reduziu de forma significativa os níveis de MDA, confirmando o dado anterior que apenas esta concentração possui efeito antioxidante. De acordo com nossos dados, Emre *et al.* (2008) mostraram que em modelo de isquemia-reperfusão intestinal o uso de nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, promoveu uma diminuição significativa nos níveis de MDA e conseqüentemente da injúria tecidual. Não foi encontrado estudo que relacione o GSNO com os níveis de MDA, mas seu efeito deve estar relacionado tanto com a liberação de NO como pela elevação de glutathione. Resultados similares foram observados nos modelos de peritonite e edema de pata, corroborando com os dados encontrados na DPE.

Não podemos descartar que parte da atividade protetora do GSNO sobre a doença periodontal seja mediada por uma ação antibacteriana. No entanto, o GSNO, sem dúvida, possui um efeito antiinflamatório e antioxidativo independente, o qual foi confirmado nos modelos não-infecciosos de edema de pata e peritonite.

Neste estudo, mostramos que o GSNO apresentou efeito antiinflamatório e antioxidativo em modelos de doença periodontal experimental, peritonite e edema de pata. Além disso, ele foi capaz de proteger as estruturas do periodonto na DPE.

6 CONCLUSÕES

- O GSNO em baixas concentrações previne a perda óssea induzida pela DPE possivelmente por seu efeito antiinflamatório e antioxidante;
- O GSNO em menores concentrações possui atividade antiinflamatória nos três modelos utilizados, isto é, DPE, peritonite e edema de pata. Efeito não encontrado na maior concentração;
- O GSNO possui efeito antioxidante nas menores concentrações. Contudo, a maior concentração não demonstrou tal efeito.

REFERÊNCIAS

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.
- ALAYAN, J.; IVANOVSKI, S.; GEMMELL, E.; FORD, P.; HAMLET, S.; FARAH, C. S. Deficiency of iNOS contributes to Porphyromonas gingivalis-induced tissue damage. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, 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. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. **J. Surg. Res.**, v. 149, p. 84-93, 2008.
- 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.
- ANDONEGUI, G.; TREVANI, A. S.; DRAN, G.; GEFFNER, J. R. Effect of nitric oxide donors on neutrophil responses induced by immune complexes. **Immunology**, v. 86, p. 646-650, 1995.
- ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; DUZZO, G.; LINDEN, R. 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. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.
- 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.

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, p. 254-260, 2002.

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.

BAUER, J. A.; RAO, W.; SMITH, D. J. Evaluation of linear polyethyleneimine/nitric oxide adduct on wound repair: therapy versus toxicity. **Wound Repair Regen.**, v. 6, p. 569-577, 1998.

BELDER, A.; LEES, C.; MARTIN, J.; MONCADA, S.; CAMPBELL, S. Treatment of HELLIP syndrome with nitric oxide donor. **Lancet**, v. 345, p. 124–125, 1995.

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.

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.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 474-484, 1993.

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.

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.

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.

BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 351, p. 261-272, 1998.

BUTLER, A. R.; RHODES, P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal. Biochem.**, v. 249, 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 (suppl), p. 1154, 1999.

CANACKI, C. F.; CICEK, Y.; YILDIRIM, A.; SEZER, U.; CANAKCI, V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. **Eur. J. Dent.**, v. 3, p. 100-106, 2009.

CARVALHO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; FALCÃO, R. A.; LIMA, R. C.; LEITÃO, R. F. C.; ALCÂNTARA, C.; H.L.P. SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; Brito, G. A.C. Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 540, p. 175–182, 2006.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, 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. U. S. A.**, v. 99, p. 13926–13931, 2002.

CHAPPLE, I. L.; BROCK, G.; EFTIMIADI, C.; MATTHEWS, J. B. Gluthathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. **Mol. Pathol.**, v. 55, p. 367-73, 2002.

CHEN, J. C.; CHEN, H. M.; SHYR, M. H.; FAN, L. L.; CHI, T. Y.; CHI, C. P.; CHEN, M. F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 99, n. 3, p. 213-218, 2000.

CIANCIO, S. G. Tetracyclines and periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 47, n. 3, p. 155-159, 1976.

CLANCY, R. M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 1141-1151, 1998.

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

CRAWFORD, J. M.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. **J. Periodontol. Res.**, v. 13, p. 316-325, 1978.

DAHAN, M.; NAWROCKI, B.; ELKAIM, R.; SOELL, M.; BOLCATO-BELLEMIN, A.; BIREMBAUT, P.; TENENBAUM, H. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingival. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 128-136, 2001.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 418-422, 1990.

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

DAMOULIS, P. D.; HAUSCHKA, P. V. Nitric oxide acts in conjunction with pro-inflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p. 412-423, 1997.

DE SOUZA, G. F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; SEABRA, A. B.; MIGUEL, D. C.; DE OLIVEIRA, M. G.; ULIANA, S. R. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 209-216, 2006.

DERAKHSHAN, B.; HAO, G.; GROSS, S. S. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, n. 2, p. 210-219, 2007.

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.** 2000, v. 23, p. 19-49, 2000.

EMRE, A.; BAYRAM, O.; SALMAN, B.; ERCAN, S.; ANADOL, Z.; AKIN, O. Sodium nitroprusside as a nitric oxide donor in a rat intestinal ischemia-reperfusion model. **Clinics**, v. 63, n. 1, p. 91-96, 2008.

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.

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.

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.

FURCHGOTT, R. F.; 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.

GILBERT, P.; TRAMINI, P.; SIESO, V.; PIVA, M. T. Alkaline phosphatase isoenzyme activity in serum from patients with chronic periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v. 38, p. 362-365, 2003.

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.

GOLUB, L. M.; GOODSON, J. M.; LEE, H. M.; VIDAL, A. M.; MCNAMARA, T. F.; RAMAMURTHY, N. S. Tetracyclines inhibits tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. **J. Periodontol.**, v. 56, p. 93-97, 1985.

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.; MATTHEWS, J. B.; CHAPPLE, I. L. Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, p. 17-23, 2010.

GRISI, M. F. M.; GRISI, D. C. Descontaminação da superfície radicular. *In*: TUNES, U. R.; RAPP, G. E. **Atualização em periodontia e implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap. 9, p. 153-164.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

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.

HOLMSTRUP, P. Anatomia microscópica do periodonto. *In*: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001. cap. 4, p. 27-46.

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.

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

IANARO, A.; O'DONNELL, C. A.; DI ROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhance interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, 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.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WEISSBACH, H.; NATHAN, C. Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 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.

KASTEN, T. P.; COLLIN-OSDOBY, P.; PATEL, N.; OSDOBY, P.; KRUKOWSKI, M.; MISKO, T. P.; SETTLE, S. L.; CURRIE, M. G.; NICKOLS, G. A. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 26, p.3569-3573, 1994.

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.; SATHISHKUMAR, 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. 1704-1712, 2007.

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.

KHAN, M.; IM, Y. B.; SHUNMUGAVEL, A.; GILG, A. G.; DHINDSA, R. K.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. **J. Neuroinflammation**, v. 4, p. 1-12, 2009.

KIKUGAWA, K.; HIRAMOTO, K.; OHKAWA, T. Effects of oxygen on the reactivity of nitrogen oxide species including peroxynitrite. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2004.

KINANE, D. F.; DARBY, I. B.; SAID, S.; LUOTO, H.; SORSA, T.; TIKANOJA, S.; MÄNTYLÄ, P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. **J. Periodontal Res.**, v. 38, p. 400-404, 2003.

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.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 59-73, 1991.

KLOEK, J.; VAN ARK, I.; BLOKSMA, N.; DE CLERCK, F.; NIJKAMP, F. P.; FOLKERTS, G. Glutathione and other low-molecular-weight thiols relax guinea pig trachea ex vivo: interactions with nitric oxide? **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 283, p. L403-L408, 2002.

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

KOIDE, M.; SUDA, S.; SAITON, S.; OFUJI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHIE, H.; TAKAI, M.; ONO, Y.; TANIGUCHI, Y.; HARA, K. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 420-434, 1995.

KOKKOLA, T.; SAVINAINEN, J. R.; MÖNKKÖNEN, K. S.; RETAMAL, M. D.; LAITINEN, J. T. S-nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. **BMC Cell Biol.**, v. 6, p 21, 2005.

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 de periodontia**. São Paulo: Quintessence editora, 2001, cap. 1, p. 3-7.

KRÖNCKE, K.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, p. 147-156, 1998.

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.

LANGFORD, E. J.; WAINWRIGHT, R. J.; MARTIN, J. F. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 16, p. 51–55, 1996.

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

LEE, P. C.; SALYAPONGSE, A. N.; BRAGDON, G. A.; SHEARS, L. L.; WATKINS, S. C.; EDINGTON, H. D.; BILLIAR, T. R. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. H1600-1608, 1999.

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.

LEITE, A. C.; CUNHA, F. Q.; DAL-SECCO, D.; FUKADA, S. Y.; GIRÃO, V. C.; ROCHA, F. A. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **Br. J. Pharmacol.**, v. 156, p. 818-825, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 37, n.3, p. 293-303, 2001.

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

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.

LIU, Q. B.; LIU, L. L.; LU, Y. M.; TAO, R. R.; HUANG, J. Y.; SHIODA, N.; MORIGUCHI, S.; FUKUNAGA, K.; HAN, F.; LOU, Y. J. The induction of reactive oxygen species and loss of mitochondrial Omi/HtrA2 is associated with S-nitrosoglutathione-induced apoptosis in human endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 244, p. 374-384, 2010.

LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; SZÉKELY, A. D.; FEHÉR, E.; DÉZSI, L.; SZABÓ, C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life Sci.**, v. 70, p. 279-290, 2001.

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. E154-159, 2007.

MA, X. L.; GAO, F.; LIU, G.; LOPEZ, B. L.; CHRISTOPHER, T. A.; FUKUTO, J. M.; WINK, D. A.; FEELISCH, M. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 14617-14622, 1999.

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.; OBINGER, 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.

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.

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, 255-264, 2006.

MATOS, M. A. A.; SANT'ANA, F. R. Identificação da isoenzima óssea de fosfatase alcalina por termoinativação. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 31, n. 3, p. 268-272, 1996.

MCCARTHY, S. M.; BOVE, P. F.; MATTHEWS, D. E.; AKAIKE, T.; VLIET, A. Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of cysteine switch. **Biochemistry**, v. 47, p. 5832-5840, 2008.

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, 1901-1909, 2005.

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.; UCHIYAMA, 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.

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.

MOMBELLI, A. Antibióticos em terapia periodontal. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 17, p. 350-363.

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.

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. S193-S201, 2006.

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.

NAKAYA, H.; OSAWA, G.; IWASAKI, N.; COCHRAN, D.L.; KAMOI, K.; OATES, T.W. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 7, p. 1158-1166, 2000.

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.

OKAMOTO, T.; VALACCHI, G.; GOHIL, K.; AKAIKE, T.; VLIET, A. S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 27, p. 463-473, 2002.

ÖVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYLMAS, 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.** 2000, v. 24, p. 239-252, 2000.

PAVLICK, K. P.; LAROUX, F. S.; FUSELER, J.; WOLF, R. E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M. B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 311-322, 2002.

PENDYALA, G.; THOMAS, B.; KUMARI, S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 12, n. 3, p. 79-83, 2010.

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.

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

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 331-338, 2004.

POPKOV, V. L.; FIL'CHUKOVA, I. A.; LAPINA, N. V.; GALENKO-YAROSHEVSKII, V. P.; DUKHANIN, A. S. Activity of nitric oxide synthase and concentration of nitric oxide end metabolites in the gingiva under experimental pathological conditions. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 140, p. 391-393, 2005.

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

RAI, B.; KHARB, S.; JAIN, R.; ANAND, S. C. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. **J. Oral Sci.**, v. 50, p. 53-56, 2008.

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.

RALSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M. H.; GRABOWSKI, P. S.; JOHNSTON, P. W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, n. 7, p. 1040-1049, 1995.

RAUHALA, P.; LIN, A. M.; CHIUEH, C. C. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. **FASEB J.**, v. 12, p. 165-173, 1998.

REHER, V. G.; ZENÓBIO, E. G.; COSTA, F. O.; REHER, P.; SOARES, R. V. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. **J. Oral Sci.**, v. 49, p. 271-276, 2007.

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.

RIZK, M.; WITTE, M. B.; BARBUL, A. Nitric oxide and wound healing. **World J. Surg.**, v. 28, p. 301-306, 2004.

ROBERTS, R. A.; LASKIN, D. L.; SMITH, C. V.; ROBERTSON, F. M.; ALLEN, E. M.; DOORN, J. A.; SLIKKER, W. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. **Toxicol. Sci.**, v. 112, p. 4-16, 2009.

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.

RYAN, M. R.; GOLUB, L. M. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as treatment strategy. **Periodontol.** 2000, v. 24, p. 226-238, 2000.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodont. Res.**, v. 17, p. 263-274, 1982.

SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI JR.; F. Benefícios do tratamento químico/medicamentoso das lesões periodontais. *In*: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 4, p. 65-75.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SAMEJIMA, Y. EBISU, S.; OKADA, H. Effect of injection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, v. 25, p. 308-315, 1990.

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.

SCHAFFER, M. R.; TANTRY, U.; GROSS, S. S.; WASSERBURG, H. L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 63, p. 237-240, 1996.

SCHAFFER, M. R.; TANTRY, U.; THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. **Eur. J. Surg.**, v. 165, p. 262-267, 1999.

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.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 1192-1205, 1968.

SHI, H. P.; MOST, D.; EFRON, D. T.; TANTRY, U.; Fischel, M. H.; Barbul, A. The role of iNOS in wound healing. **Surgery**, v. 130, p. 225-229, 2001.

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: potential uses for local and controlled nitric oxide release. **Biomaterials**, v. 24, p. 3543-3553, 2003.

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, 1996a.

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, 1996b.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Matriz metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Dis.**, v. 10, 311-318, 2004.

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 potential therapeutic target? **Keio J. Med.**, v. 58, n. 1, p. 29-40, 2009.

TAI, C. C.; CHEN, H. S.; CHEN, S. L.; HO, Y. P.; HO, K. Y.; WU, Y. M.; HUNG, C. C. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v. 40, p. 378-384, 2005.

UĞAR-ÇANKAL, D.; OZMERIC, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clin. Chim. Acta**, v. 366, p. 90-100, 2006.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the patogenesis 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. S78-S87, 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.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, v. 103, p. 255-261, 2001.

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.

WOLF, H. F.; EDITH, M.; RATEITSCHAK, K. H. Introdução. *In*: WOLF, H. F.; EDITH, M.; RATEITSCHAK, K. H. **Atlas coloridos de Odontologia – Periodontia**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006, cap. 1, p. 2.

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 cyclooxygenase-2 in chronic periodontitis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, p. 861-867, 2003.