



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Stemodia maritima* Linn. NA MODULAÇÃO DA
REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM UM
MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS**

SOBRAL
2017

ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA

EFEITO DO EXTRATO DE *Stemodia maritima* Linn. NA MODULAÇÃO DA
REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM UM
MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirna Marques Bezerra.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Hellíada Vasconcelos Chaves.

SOBRAL

2017

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

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

- T264e Teixeira, Alrieta Henrique.
Efeito do extrato de *Stemodia maritima* Linn. na modulação da reabsorção óssea inflamatória e estresse oxidativo em um modelo de periodontite experimental em ratas. / Alrieta Henrique Teixeira. – 2017.
101 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra.
Coorientação: Profa. Dra. Helláda Vasconcelos Chaves.
1. *Stemodia maritima* L.. 2. Periodontite.. 3. Reabsorção Óssea.. I. Título.

CDD 660.6

ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA

EFEITO DO EXTRATO DE *Stemodia maritima* Linn. NA MODULAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mirna Marques Bezerra (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a Karuza Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral (UFC)

Prof. Dra. Tatiane Santi Gadelha
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dedico essa trajetória,
A Deus.
À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Que minunciosamente cria e recria toda minha existência e me acompanha a cada passo, me orientando para que eu possa ir ao Seu encontro. Obrigada, Senhor, por estar bem perto todos os dias e me ensinar que “Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.” (Eclesiastes 3:1).

Aos meus pais, Alberto e Marieta, e minha irmã, Alritércia,

Que mesmo distantes emanam inefável amor. Obrigada pela constante torcida e orações, pelas lições de vida, de superações e vitórias.

Ao meu esposo, Vicente Pinto,

Que mesmo imerso em suas inúmeras ocupações e demandas, se faz tão presente. Obrigada por todo amor dedicado, pelo constante e imensurável apoio.

Por ser exemplo de caráter e retidão.

Aos meus filhos, Matheus e Rodrigo,

Que me fazem crescer a cada dia na missão da maternidade. Obrigada pela energia da juventude, pelos desafios de educá-los em tempos tão diferentes, por me instigarem a ser uma pessoa melhor.

À minha orientadora, profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner,

Por ser uma pessoa iluminada, por seu exemplo de Fé e perseverança. Pelo bom humor mesmo diante das tempestades, porque “às vezes Deus as acalma, às vezes Ele acalma o marinheiro, mas em outras Ele ensina a nadar”. Obrigada por ser uma pesquisadora tão sensível e competente. Agradeço pela amizade, confiança, dedicação e apoio de sempre.

À minha co-orientadora profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves,

Por sua inestimável contribuição na co-orientação e execução desta pesquisa. Por seu exemplo de garra e determinação. Por sua dedicação e competência no desempenho das funções confiadas. Obrigada pelo apoio e exemplo de que a força de vontade é a primeira motivação para a realização de qualquer projeto.

Aos animais de experimentação por serem instrumentos das inquietudes científicas.

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. **Henry de Holanda Campos**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, em nome do seu Coordenador Prof. Dr. **Arlindo de Alencar Araripe Moura**, a todo corpo docente e seu secretariado.

Às instituições de fomento, Capes/Funcap e CNPq.

Aos professores Dr. **José Roberto Viana Silva**, Dra. **Karuza Maria Alves Pereira**, Dra. **Tatiane Santi Gadelha** e Dr. **Carlos Alberto de Almeida Gadelha**, membros da banca examinadora pela inestimável contribuição na avaliação da tese.

À Faculdade de Medicina – FAMED da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, pelos espaços físicos cedidos.

Ao Laboratório de Farmacologia de Sobral – LAFS da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, em nome das professoras Dra. **Hellíada Vasconcelos Chaves** e Dra. **Mirna Marques Bezerra**, por receber de forma tão acolhedora tantos estudantes de graduação e pós-graduação, proporcionando o desenvolvimento de inúmeras pesquisas e enriquecimento científico.

À Profa. Dra. **Ângela Martha Campos Arriaga**, pelo fornecimento do extrato sem o qual a realização desse trabalho não seria possível. Pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil com que sempre nos atendeu.

Às professoras Dra. **Karuza Maria Alves Pereira**, Dra. **Iracema Matos Melo** e ao Prof. Dr. **Igor Iuço Castro da Silva** pela valiosa contribuição nas análises histopatológicas, pelos ensinamentos, sugestões e por toda atenção dispensada.

À Profa. Dra. **Paula Goes**, pela determinação, vibração e energia na condução da arte e desafios da docência. Obrigada pela amizade e carinho.

À **Jordânia Marques Freire** (Jordas), companheira de todos os momentos e experimentos. Obrigada pela presença constante, por sua competência profissional e por ser uma pessoa sempre disponível a ajudar e ouvir além dos achados científicos. Serei eternamente grata a esta amizade.

Aos meus colegas e amigos docentes do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, em nome dos professores Dr. **Bruno Sousa** e Dra. **Mariana Ramalho**, por entenderem a minha necessidade de afastamento para execução desta pesquisa, pelas boas vibrações e fraterna amizade.

Aos colegas de doutorado, em especial àqueles com os quais convivi mais de perto, **Danielle Rocha do Val, Jordânia Marques Freire, Débora da Silva Freitas Ribeiro, José Jackson do Nascimento Costa, Maria Amélia Costa, Anderson Weyne, Isabela Ribeiro Pinto, Luzia Hermínia Teixeira de Sousa**, por todo aprendizado adquirido nesse tempo de desafios e metas, e também, pelos assuntos aleatórios que descontraem e alegam a rotina.

Aos estudantes de mestrado da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, **Tamara Sousa, Felipe Dantas, Alfredo Parente, Karysia, Shirley, Sheila, Marco Eber, Angelo e Trycia** pela alegria do convívio.

Aos estudantes de Iniciação Científica e voluntários do LASF, **Thaís Parente, Janine Bastos Madeiro, Bárbara Bastos Madeiro, Aline Cunha, Samuel Mateus, Natacha Arriaga, Júlio César, Hermany, Isaac Fernandes, Mateus, Larissa, Sebastião, Breno, Edenizar**, por toda ajuda, disponibilidade e dedicação. Obrigada por tornarem os dias de experimento mais descontraídos com a alegria de vocês.

Aos técnicos do laboratório de histologia **Junior Lima e Anderson Weyne**, por toda dedicação nos cortes histológicos e pela amizade.

À técnica do laboratório de Farmacologia, **Nayara Alves**, pela seriedade, dedicação e empenho que dedica às suas funções, mas principalmente, pela amizade iniciada e partilhada neste curto tempo.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina – *Campus* Sobral, em nome do Sr. **Araújo**, por todo empenho e dedicação em suas atividades.

Às amigas, **Kátia Linhares Lima Costa e Virgínia Régia Sousa da Silveira**, pela sincera amizade e constante disponibilidade em diversas ocasiões, pelo exemplo de garra e determinação.

Aos colegas e amigos do **Centro de Especialidades Odontológicas Reitor Ícaro de Sousa Moreira**, pelos momentos de partilha profissional e pessoal. Por sempre me motivarem a buscar mais conhecimento e não desistir dos sonhos.

À família **Sprint Training**, por me estimular no cuidado com a saúde, essencial para o equilíbrio físico e mental.

A todos os meus amigos e irmãos das Equipes de Nossa Senhora, em nome do Pe. **Fábio Soares**, pelas orações e torcida, por compreenderem minhas fragilidades e ausências quando o corpo físico não esteve presente, mas o pensamento sim. Por toda alegria e paz que me proporcionam.

A todos que de alguma forma contribuíram e apoiaram o desenvolvimento da pesquisa e meu crescimento pessoal.

***“Quando os meus olhos não podiam
ver, Tua mão segura me ajudou a
andar...” (Pe. Fábio de Melo)***

RESUMO

Investigou-se a eficácia e toxicidade do extrato de *Stemodia maritima* Linn. (*S. maritima*) em um modelo de periodontite induzida por ligadura em ratas. A periodontite experimental foi induzida adaptando-se um fio de náilon estéril (3-0) em torno do 2º molar superior esquerdo em animais do grupo veículo (salina associada ao dimetilsulfóxido – DMSO) e dos grupos com diferentes concentrações do extrato de *S. maritima* (0.2, 1 e 5 mg/Kg) os quais receberam as respectivas soluções via gavagem durante 11 dias. Animais do grupo naive (controle) não sofreram nenhuma manipulação cirúrgica. Após esse período, os animais foram eutanasiados, as maxilas removidas para análises morfométrica e histológica (HE), o tecido gengival foi utilizado para dosagens de citocinas (TNF- α , IL1- β , IL-8/CINC-1 e IL-10), dosagens das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e análise da expressão gênica por qRT-PCR de marcadores da inflamação e do metabolismo ósseo (TNF- α , IL1- β , RANK e iNOS). Os parâmetros sistêmicos analisados foram: variação ponderal, níveis séricos de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT), creatinina, fosfatase alcalina total (FAT) e fosfatase alcalina óssea (FAO) e avaliação histológica dos órgãos (estômago, fígado, rim e coração). Os dados paramétricos foram avaliados empregando o teste de análise de variância (ANOVA) e os testes de comparações múltiplas de Tukey ou Games-Howell. Para dados não paramétricos, os resultados foram expressos em mediana e avaliados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$). *S. maritima* 5 mg/kg reduziu a perda óssea alveolar e os níveis de TNF- α e CINC-1 quando comparados ao grupo veículo ($p < 0,05$). IL-1 apresentou tendência à redução, porém sem significância estatística. Níveis de IL-10, das enzimas SOD e CAT e da variação da FAO estavam elevados no grupo *S. maritima* 5 mg/kg em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). Histologicamente, *S. maritima* 5 mg/kg preservou as estruturas do periodonto demonstrando efeito protetor dos tecidos de suporte ósseo, além da redução da expressão gênica de TNF- α , IL1- β , RANK e iNOS. Variação ponderal, AST, ALT, creatinina e FAT apresentaram $p > 0,05$. Os resultados indicam efeito protetor de *S. maritima* 5 mg/kg em ensaio pré-clínico de periodontite experimental em ratas devido a inibição de parâmetros inflamatórios, da perda óssea alveolar e marcadores do estresse oxidativo, representando uma possível opção terapêutica.

Palavras-chave: *Stemodia maritima* L.. Periodontite. Reabsorção óssea.

ABSTRACT

This research investigated the efficacy and toxicity of *Stemodia maritima* Linn. (*S. maritima*) extract in a model of ligature-induced periodontitis in female Wistar rats. Experimental periodontitis was induced by placing a sterilized nylon (3-0) thread around the cervix of the upper left 2nd molar in animals of vehicle group (saline associated with the diluent dimethylsulfoxide - DMSO) and those of three other groups, with different concentrations of the *S. maritima* extract (Sm0.2, Sm1 and Sm5 mg / kg) which received the respective solutions via gavage for 11 days. Animals of naive group (control) were not submitted to any surgical manipulation. After this period, the animals were euthanized, the maxillae were removed for morphometric and histological analyzes (H&E). Gingival tissues were dissected for cytokine (TNF- α , IL1- β , IL-8/CINC-1 and IL-10), enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) dosages and gene expression by qRT-PCR of markers of inflammation and bone metabolism (TNF- α , IL1- β , RANK e iNOS). Systemic parameters were analyzed as the weight variation, serum levels of hepatic enzymes (aspartate aminotransferase – AST and alanine aminotransferase – ALT), creatinine, total alkaline phosphatase (TALP), and bone alkaline phosphatase (BALP). We also performed the histological analyses of stomach, liver, kidney and heart. Parametric data were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) and Tukey or Games-Howell multiple comparisons tests. For non-parametric data, the results were expressed as median and evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's test. *S. maritima* 5mg/kg reduced ($p < 0.05$) alveolar bone loss, TNF- α and CINC-1 when compared to the vehicle group ($p < 0.05$). IL-1 showed a tendency to reduce, but did not obtain statistical values. Levels of IL-10, SOD and CAT enzymes levels and also the variation of BALP increased in *S. maritima* 5mg/kg group in relation to the vehicle group ($p < 0.05$). Histologically, *S. maritima* 5mg/kg preserved periodontal structures demonstrating the protective effect of the tissues of bone support and also reduced the gene expression of TNF- α , IL1- β , RANK and iNOS. Weight variation, AST, ALT, creatinine and TALP presented $p > 0.05$ between groups. The results indicated that *S. maritima* 5mg/kg had a protective effect on experimental periodontitis due to the inhibition of inflammatory parameters, alveolar bone loss and oxidative stress markers, representing a therapeutic option in the preclinical periodontitis in rats.

Keywords: *Stemodia maritima* L.. Periodontitis. Bone resorption.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Articulação Têmporo-Mandibular
BPFC	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSH Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Macrófago
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
NF-kB	Fator Nuclear kapa B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares

PTH	Hormônio da Paratireoide
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do Receptor do Fator Nuclear kapa B
REBLAS	Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante beta
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TNF - α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Justificativa	19
1.2	Objetivo Geral	20
1.2.1	<i>Objetivos Específicos</i>	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Metabolismo Ósseo	22
2.2	Periodontite: Etiopatogenia e Fisiopatologia	25
2.2.1	<i>Periodontite e Citocinas</i>	29
2.2.2	<i>Periodontite e Óxido Nítrico</i>	31
2.2.3	<i>Periodontite e Espécies Reativas de Oxigênio</i>	32
2.2.4	<i>Modelos Animais utilizados na Periodontite</i>	34
2.3	Plantas Medicinais	36
2.3.1	<i>Família Plantaginaceae</i>	38
2.3.2	<i>Gênero Stemodia e Espécie Stemodia maritima Linn.</i>	39
3	CAPÍTULOS	41
3.1	Artigo 1	41
3.2	Artigo 2	70
4	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	101

1 INTRODUÇÃO

O termo “doença periodontal” é usado em sentido amplo para abranger todas as condições patológicas que acometem as estruturas do periodonto de proteção e/ou sustentação. Embora existam várias nomenclaturas e formas de classificação, a categorização geral em gengivite e periodontite é considerada a mais objetiva. Em 1999, em um encontro internacional promovido pela Academia Americana de Periodontia, uma nova classificação foi estabelecida, incluindo detalhes necessários para a caracterização mais adequada ao amplo espectro de doenças periodontais encontradas na prática clínica (ARMITAGE, 1999; GENCO; BORGNAKKE, 2013; JACOB, 2012). A etiologia e a patogênese das doenças periodontais têm sido objeto de muitos estudos nas últimas décadas. O quadro de gengivite é limitado ao periodonto de proteção e é caracterizado por um aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular além do influxo de células do sangue periférico para o tecido conjuntivo subjacente ficando restrita ao espaço da gengiva marginal livre. A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo desequilíbrio na homeostase entre o microbioma subgengival e as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro além da influência de eventos ambientais adversos, fatores de risco e de suscetibilidade genética, envolvendo os tecidos de suporte do dente com progressiva perda de inserção, formação de bolsa periodontal e reabsorção do osso alveolar (ARMITAGE, 2013; GENCO; BORGNAKKE, 2013).

As doenças periodontais inflamatórias são identificadas atualmente como doenças dentárias que afetam as populações humanas mundiais apresentando altas taxas de prevalência e morbidade. Por meio dos dados epidemiológicos, pode-se averiguar sua distribuição e os fatores que influenciam sua frequência, sendo um recurso fundamental para desenvolver diretrizes que possam gerar inferência sobre os determinantes da doença, mas eles não fornecem evidências acerca de sua etiologia específica (GARCIA; DIETRICH, 2012).

Dados mundiais concernentes ao status da condição periodontal das populações na primeira década do século XXI não são conhecidos devido à carência de pesquisas nacionais ou regionais, além das metodologias distintas utilizadas que não permitem comparações. Entre os adultos com menos de 55 anos de idade, a profundidade de bolsa ≥ 4 mm diminuiu na Austrália, no Reino Unido e nos EUA, mas aumentou na Alemanha e na Hungria (DYE, 2012). Entretanto, não há informações atuais

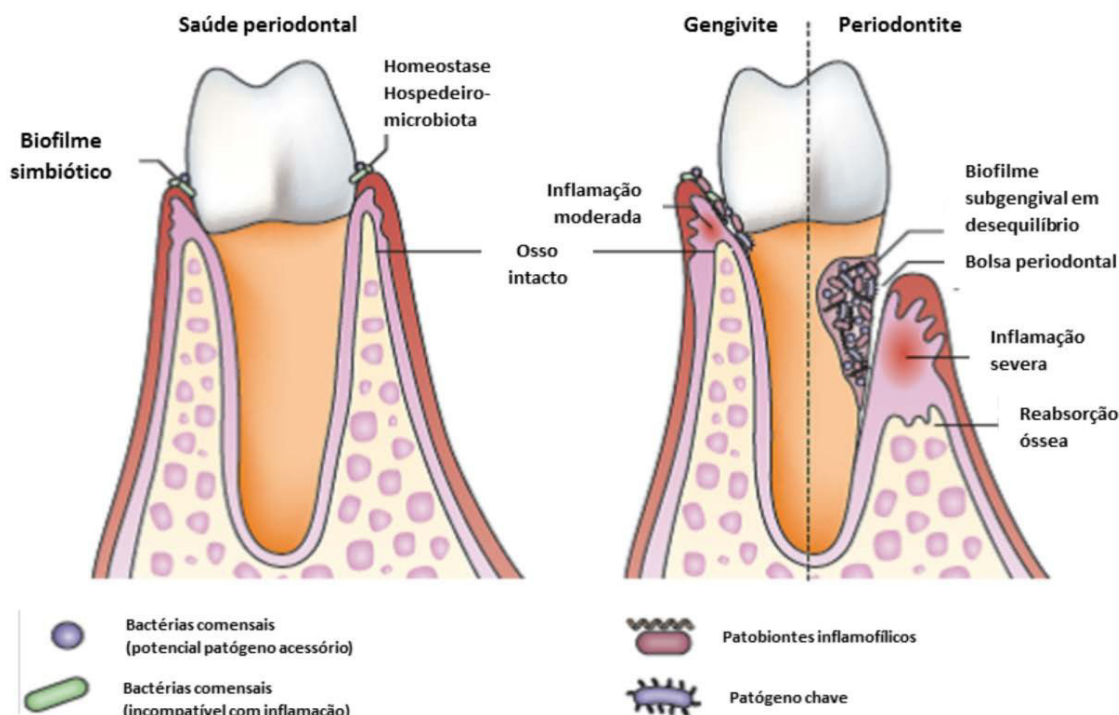
suficientes para refutar as estimativas anteriores da Organização Mundial da Saúde – OMS onde foi relatado que 10 a 15% dos indivíduos sofrem de periodontite. Os dados revelam que a doença foi observada em diversas classes socioeconômicas e culturais e em várias faixas etárias, embora exista uma correlação positiva entre idade, higiene oral inadequada e gravidade da doença (DYE, 2012; PETERSEN *et al.*, 2005; THOMSON; SHEIHAM; SPENCER, 2012; WHO, 2013).

Mesmo considerando a periodontite uma doença tratável, ela representa uma das causas mais comuns das perdas dentárias, conseqüentemente, reduzindo a capacidade mastigatória, dificultando e limitando o consumo de diversos alimentos, afetando a fonação e causando danos estéticos que podem desencadear alterações psicossociais. Além disso, a periodontite também constitui um fator de risco significativo para as doenças cerebrovasculares, diabetes tipo 2, parto prematuro, artrite e doenças cardiovasculares. Esse conjunto de repercussões no cotidiano dos pacientes contribui significativamente para a redução de sua qualidade de vida (BORGNAKKE, 2015; WANG *et al.*, 2014).

No Brasil, as doenças periodontais representam um grave problema de saúde pública. De acordo com os dados do Ministério da Saúde, sua alta incidência e prevalência estão associadas aos piores indicadores socioeconômicos, como baixa renda e pouca escolaridade. Dados coletados na Pesquisa Nacional de Saúde Bucal demonstraram que o percentual de brasileiros com problemas periodontais, de acordo com a faixa etária, foi de 32% para a idade de 12 anos, 49% para a faixa de 15 a 19 anos, 83% para os adultos de 35 a 44 anos e 98,2% nos idosos de 65 a 74 anos. As formas mais graves da doença periodontal aparecem de modo mais significativo nos adultos, em que se observa uma prevalência de 19% (BRASIL, 2011; CHAMBRONE; LIMA; CHAMBRONE, 2003; VETTORE; DE AMORIM MARQUES; PERES, 2014).

Sua patogênese está associada a um dinâmico processo imunoinflamatório do hospedeiro em resposta à presença de biofilme polimicrobiano aderido à superfície dental, o qual atua como agente etiológico primário (Figura 1). O conhecimento sobre os mecanismos imunológicos e como as respostas inflamatórias são reguladas é fundamental para elucidar a patogênese de doenças complexas como a periodontite. (ARMITAGE, 2013; DENTINO *et al.*, 2013; GENCO; BORGNAKKE, 2013).

Figura 1. Ilustração das condições de saúde periodontal, gengivite e periodontite.



Fonte: Adaptado de Hajishengallis, 2015.

Legenda: Progressão do estado de saúde periodontal (sulco gengival ≤ 2 mm de profundidade) para um quadro de gengivite, com inflamação periodontal sem perda óssea e com profundidade de sondagem ≤ 3 mm. Quadro de periodontite com bolsa periodontal ≥ 4 mm de profundidade e quadro inflamatório associado à perda óssea. A bolsa periodontal funciona como um nicho para a colonização de micro-organismos periodontopatogênicos.

O tratamento para a periodontite pode incluir a intervenção não cirúrgica e a cirúrgica. Os procedimentos mecânicos tradicionais envolvendo a raspagem, alisamento e polimento, a fim de descontaminar a superfície coronária e radicular para a melhoria do estado de saúde periodontal, são a primeira escolha na maioria dos casos. Contudo, são considerados tratamentos longos, dependentes do operador e do paciente e podem, eventualmente, comprometer o cimento, a dentina, o ligamento periodontal e o osso alveolar, gerando recessão gengival e sensibilidade. Embora as intervenções mecânicas e cirúrgicas sejam os métodos mais utilizados para controlar a progressão da doença, a instrumentação inevitavelmente deixa um número significativo de micro-organismos remanescentes (SANTOS *et al.*, 2016). A colonização destes agentes patogênicos pode ocorrer dentro de poucos dias após a intervenção, resultando na necessidade de visitas regulares de manutenção. A utilização de agentes terapêuticos como coadjuvantes para o desbridamento mecânico e cirúrgico é indicado, sendo empregados por via tópica ou sistêmica, atuando sobre os patógenos e modulando a resposta do hospedeiro. Entretanto,

essas medicações muitas vezes promovem efeitos apenas paliativos sem interferir no curso evolutivo da doença devido à peculiaridade das respostas inerentes ao paciente e sua motivação individual (SANTOS *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Estudos experimentais recentes têm observado as atividades biológicas de fitoquímicos naturais isolados de plantas sendo consideradas boas alternativas aos produtos químicos sintéticos. A busca e a utilização de plantas com propriedades medicinais é uma prática milenar, atestada em vários tratados de fitoterapia de grandes civilizações que desenvolveram maneiras particulares de explorá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Estima-se que cerca de 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de vegetais superiores (FUNARI; FERRO, 2005; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Embora grande parte do potencial da biodiversidade ainda permaneça inexplorada, diferentes estudos farmacológicos com produtos obtidos de plantas da flora brasileira revelam o potencial terapêutico de várias espécies em modelos que amenizam o dano inflamatório e a dor por diferentes estímulos (SARAIVA *et al.*, 2015).

Sabe-se que a flora brasileira representa mais de 20% das espécies vegetais conhecidas no mundo, embora se observe uma subutilização deste potencial como fonte de novas moléculas e se constate que seu consumo está normalmente associado a pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tendo seu uso e indicação respaldados apenas pela própria comunidade. Tais práticas trouxeram à tona a discussão do uso indiscriminado de produtos de origem natural, que pode trazer consequências desastrosas à saúde da comunidade e a necessidade de regulação das pesquisas verificando a qualidade, eficácia e segurança desses produtos (CALIXTO, 2000, 2005; MIGUEL *et al.*, 2017). Diante desse cenário, muitas têm sido as iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, para viabilizar a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, tendo como linhas condutoras a preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável de uma terapêutica complementar, além do benefício à população brasileira (BRASIL, 2006; DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

De fato, a identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas

de saúde pública, contribuindo para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo com embasamento científico mediante a realização de pesquisas que comprovem as atividades farmacológicas e/ou toxicológicas (CALIXTO, 2000; MIGUEL *et al.*, 2017). Dentre toda diversidade da flora brasileira, o gênero *Stemodia* (Família: Plantaginaceae) possui a espécie *Stemodia maritima* Linn., conhecida popularmente como 'melosa', um arbusto rasteiro bastante comum na costa marítima. Entretanto, há poucos relatos demonstrando sua utilização no tratamento de doenças em geral (DA SILVA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2010; RUSSELL *et al.*, 2011). Trabalhos já realizados por nosso grupo verificaram o potencial efeito antioxidante e antimicrobiano de compostos isolados (stemodina, stemodinoside B e crenatoside) (DA SILVA *et al.*, 2014). Entretanto, o processo de extração e isolamento destes compostos ainda não produz quantidade suficiente para análise sistêmica. Outro recente estudo, ainda não publicado, observou seu considerável efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelo de artrite induzida na articulação têmporo-mandibular (ATM) de ratos. Contudo, não há relatos sobre sua atividade na modulação imunoinflamatória da doença periodontal, na reabsorção óssea alveolar e atividade antioxidante nos tecidos periodontais. A utilização de *Stemodia maritima* L. nesse contexto é inédita, sendo necessário avaliar seu potencial benefício.

1.1 Justificativa

Intervenções adequadas para o controle e tratamento da periodontite são essenciais para a manutenção da saúde bucal e geral do indivíduo. As perdas dentárias decorrentes da evolução da periodontite constituem uma marca da desigualdade social, reduzindo sobremaneira a qualidade de vida dos indivíduos sujeitos a essa situação (FORD; GAMONAL; SEYMOUR, 2010). O estudo da periodontite por meio de modelos animais que mimetizam os principais achados clínicos desse processo patológico contribui para o esclarecimento do papel da resposta imune-inflamatória do hospedeiro na evolução da doença, fomentando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o manejo de uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2005). O estudo da possível eficácia e segurança da *Stemodia maritima* L., na periodontite em ratos poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para o manejo da periodontite. Destarte, buscou-se

compreender parte da complexa rede de eventos bioquímicos que formam a base da fisiopatologia da periodontite, na perspectiva do desenvolvimento de opções terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo dessa doença, aumentando a adesão do paciente e as chances de êxito da terapia, contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos pacientes portadores destes processos inflamatórios crônicos.

1.2 Objetivo Geral

Investigar a eficácia e a toxicidade do extrato de *Stemodia maritima* L. em um ensaio pré-clínico de periodontite induzida por ligadura em ratas, analisando o envolvimento de citocinas, enzimas moduladoras do estresse oxidativo e marcadores do metabolismo ósseo.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Produzir uma revisão sistemática da literatura incluindo artigos relevantes que investiguem a utilização de plantas medicinais como terapia coadjuvante no tratamento da periodontite em ensaios pré-clínicos em modelo induzido por ligadura em ratos.
- Analisar a eficácia de *Stemodia maritima* sobre a perda óssea alveolar após 11 dias de tratamento em ratas submetidas à indução da periodontite;
- Dosar citocinas (TNF- α , IL-1 β , CINC-1 e IL-10) no tecido gengival de ratas submetidas à indução da periodontite e tratadas com *Stemodia maritima*;
- Investigar por qRT-PCR a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , RANKL e iNOS no tecido gengival de ratas submetidas à indução da periodontite e tratadas com *Stemodia maritima*;
- Analisar a atividade das enzimas moduladoras do estresse oxidativo, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- Analisar a toxicidade do extrato de *Stemodia maritima* em ratas submetidas à indução da periodontite e tratadas durante 11 dias com essas ferramentas farmacológicas verificando a variação ponderal e dosagens séricas de marcadores bioquímicos (fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina óssea, creatinina, alanina amino transferase – ALT e aspartato amino transferase – AST).

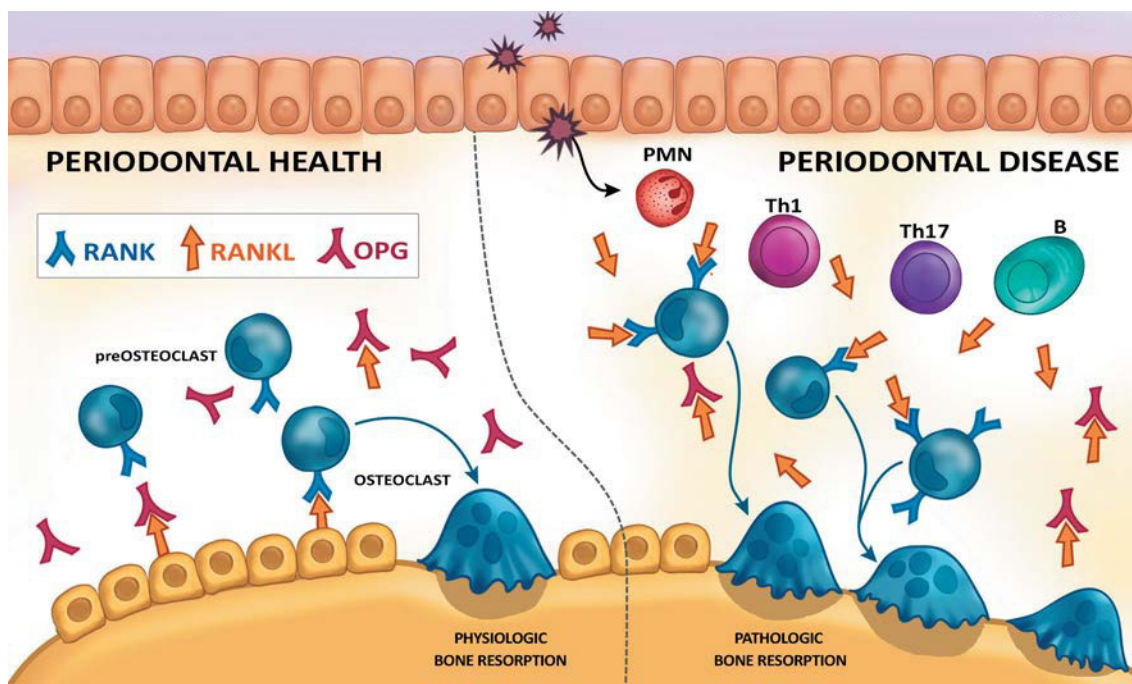
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metabolismo Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo multifuncional, metabolicamente muito dinâmico, constituído por uma população heterogênea de células, que inclui osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células endoteliais, células hematopoiéticas, entre outras, além de substâncias inorgânicas e orgânicas como o colágeno. O tecido ósseo possui funções básicas como suporte, proteção, locomoção, regulação dos níveis de cálcio no sangue e armazenamento de fosfato, que são controlados por fatores sistêmicos como os hormônios e fatores locais como os fatores de crescimento e citocinas. Participam dessa regulação diversos hormônios cálcio-trópicos sistêmicos, como o paratormônio (PTH), estrogênios, calcitonina, glicocorticoides, insulina, colecalciferol (vitamina D3), uma variedade de reguladores biológicos que controlam o metabolismo ósseo local, autócrinos e parácrinos, incluindo citocinas, prostaglandinas (PGs) e fatores de crescimento que atuam em conjunto, regulando as atividades celulares em um processo contínuo de renovação e remodelação. Esta atividade é consequência, em sua maior parte, das ações antagônicas dos osteoblastos/osteócitos e dos osteoclastos (CLARKE, 2008; DATTA *et al.*, 2008).

Durante a resposta inflamatória, citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 11 (IL-11), interleucina 17 (IL-17), podem induzir a osteoclastogênese e a perda óssea, pelo aumento da expressão de RANKL, ligante do receptor do ativador do fator nuclear kapa B (RANK) e diminuição de osteoprotegerina (OPG). Por outro lado, mediadores anti-inflamatórios como, interleucina 10 (IL-10) e interferon- γ (IFN- γ), podem diminuir a expressão de RANKL e aumentar a expressão de OPG, inibindo a osteoclastogênese. IL-1 β , IL-6 e o TNF- α estão mais diretamente implicadas na estimulação da reabsorção osteoclástica. A remodelação óssea requer um delicado equilíbrio homeostático entre essas atividades que é obtido pelo desempenho coordenado de suas funções específicas garantindo assim, que as lacunas de reabsorção geradas por osteoclastos sejam preenchidas com novo osso produzido por osteoblastos (CLARKE, 2008; HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; ZHAO, 2017) (Figura 2).

Figura 2. Osteoimunologia da doença periodontal.



Fonte: SILVA *et al.*, 2015.

Legenda: O equilíbrio de RANKL/OPG define a regulação da reabsorção do osso alveolar. A diferenciação e ativação osteoclástica são conduzidas pela interação RANK-RANKL. A OPG é um inibidor natural da interação RANK-RANKL. No processo inflamatório, a razão entre RANKL/OPG aumenta e leva a um maior estímulo da atividade osteoclástica e reabsorção óssea patológica.

Os osteoblastos são células diferenciadas derivadas de células progenitoras oriundas das células tronco mesenquimais. São responsáveis pela produção da matriz óssea orgânica, secretando colágeno, principalmente do tipo I, e a substância fundamental, que constituem o osteóide e situam-se em aposição ao osso em formação (JENSEN; GOPALAKRISHNAN; WESTENDORF, 2010). Essas células também participam da calcificação da matriz, através da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina para o interior desta, durante o período em que a célula está produzindo a matriz óssea. A fosfatase alcalina cliva o pirofosfato e assim remove sua influência estabilizadora, ao mesmo tempo em que aumenta o fosfato local para a cristalização. Durante o crescimento e remodelação óssea, os osteoblastos secretam vesículas ricas em íons cálcio para o osteóide em calcificação. Os íons fosfato e cálcio se agregam no centro da vesícula, formando os cristais de hidroxiapatita. Pela sua solubilização no sangue, o nível sanguíneo da fosfatase alcalina óssea é geralmente usado como indicador da taxa de remoção óssea (BOIVIN *et al.*, 2008; BOIVIN; MEUNIER, 2002).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas provenientes de precursores mononucleares hematopoiéticos das linhagens de monócitos / macrófagos. São responsáveis pela degradação da matriz óssea mineralizada, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exhibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova, onde perifericamente, há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa, diretamente apoiada na matriz óssea, denominada de zona clara. A zona clara, porção desprovida de organelas e rica em actina e miosina, está intimamente aderida à superfície óssea. Assim, ela parece ser responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea, delimitando, desta forma, a borda em escova, compartimento onde ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo. Este compartimento cria um microambiente propício para a liberação e atividade das enzimas proteolíticas do osteoclasto, que, junto da geração de prótons pela enzima anidrase carbônica, promove um ambiente ácido, ocorrendo a desmineralização da matriz (DATTA *et al.*, 2008; ERIKSEN, 2010).

Na osteoclastogênese, RANKL e o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) induzem a expressão de genes que tipificam a linhagem dos osteoclastos, incluindo aqueles que codificam a fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), a catepsina K, o receptor para calcitonina e a β 3-integrina, levando ao desenvolvimento de osteoclastos maduros. Proteínas sinalizadoras como a OPG, RANKL e M-CSF, embora minoritárias no tecido ósseo, desempenham papéis fundamentais nos processos de remodelamento. O sistema RANK/RANKL/OPG desempenha papel chave na sinalização da osteoclastogênese e da remodelação óssea interagindo com diversas vias de sinalização (BOIVIN *et al.*, 2008; CLARKE, 2008; WADA *et al.*, 2006). O RANKL é produzido pelos osteoblastos, tanto na forma solúvel como na forma de membrana; seu receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear kapa B) é expresso na superfície de células progenitoras pré-osteoclásticas. A interação entre RANK/RANKL induz a diferenciação e a formação de osteoclastos maduros multinucleados, estimulando, conseqüentemente, a perda óssea. A OPG também é produzida pelos osteoblastos e atua como receptor solúvel para RANKL, pois ao se acoplar com RANKL inibe a ligação RANK/RANKL, prevenindo a ativação do 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 (CHEN *et al.*, 2014; WADA *et al.*, 2006).

Uma série de condições como idade, doenças ósteo-metabólicas, mobilidade diminuída, ação de algumas drogas, podem alterar este equilíbrio entre formação e reabsorção, levando ao predomínio de um sobre o outro (VIEIRA, 1999). As doenças ósseas, causadas pela perda óssea e a perda de qualidade óssea, constituem um grande problema de saúde no envelhecimento da população e estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. A reabsorção óssea que não é totalmente compensada pela neoformação óssea constitui um mecanismo crítico em patologias ósseas, como osteoporose, artrite reumatoide, doença de Paget, mieloma múltiplo e periodontite (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016; ZHAO, 2017).

2.2 Periodontite: Etiopatogenia e Fisiopatologia

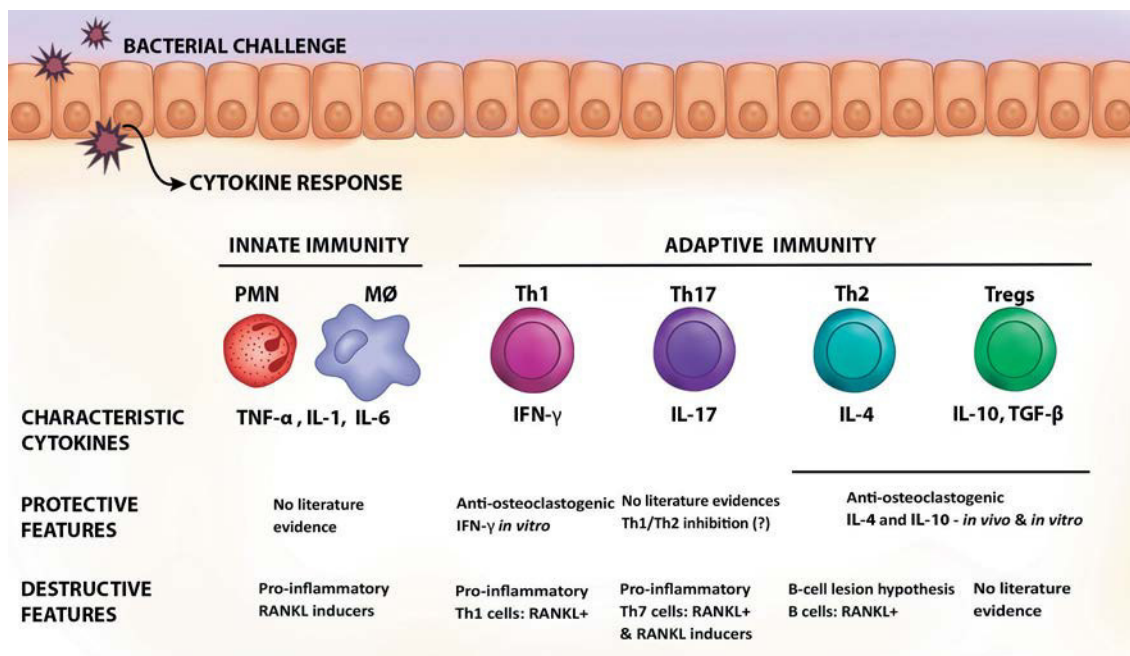
Na patogênese da periodontite desencadeiam-se vários processos inflamatórios e imunológicos que, intrínseca e dinamicamente, compõem a resposta do hospedeiro frente à injúria. As reações do hospedeiro ao agente infeccioso podem ser de caráter inespecífico (inatas) e específico (adaptativas). As reações inatas incluem a resposta inflamatória imediata e não envolvem mecanismos imunológicos. As reações adaptativas tendem a ser mais efetivas, visto que desencadeiam uma resposta imunológica com envolvimento de mecanismos celulares e não celulares direcionados aos agentes que causaram a agressão crônica (Figura 3) (KAYAL, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Na resposta imediata, a inflamação consiste basicamente na resposta vascular e celular com migração e ativação de neutrófilos polimorfo nucleares (PMN) que constituem 90% dos leucócitos da cavidade oral, além de reações sistêmicas envolvendo simultaneamente, um processo de destruição e reparo tecidual.

No processo inflamatório observa-se, macroscopicamente, vermelhidão e edema como resultado da vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo. O edema é consequência do aumento da permeabilidade vascular e escoamento das proteínas plasmáticas, o que cria um potencial osmótico que atrai fluidos para os tecidos. Em relação às alterações vasculares, ocorre um acúmulo de células inflamatórias infiltrando a lesão. A dor é uma ocorrência rara na doença periodontal, particularmente nos estágios iniciais, todavia, pode ocorrer em virtude do estímulo dos nervos

aferentes gerados pelos mediadores químicos da inflamação (CEKICI *et al.*, 2014; EBERSOLE *et al.*, 2016).

Figura 3. Citocinas e doença periodontal.



Fonte: SILVA *et al.*, 2015.

A inflamação inicial nos tecidos periodontais pode ser considerada como um mecanismo de defesa fisiológico contra os desafios microbianos. Nesse estágio, verifica-se clinicamente a formação de placa bacteriana supra ou subgingival, pode haver a presença de cálculo, edema e sangramento. No sulco gengival, os PMN, tentam eliminar os micro-organismos por meio da fagocitose e simultânea liberação de substâncias inflamatórias e antibacterianas como lisozimas, lactoferrinas, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas e mieloperoxidasas (MPO), bem como espécies reativas de oxigênio (VAN DYKE; VAN WINKELHOFF, 2013). Se o agente irritante for removido, há um retorno à homeostase e a doença não se instala. Caso não seja removido, estabelece-se um quadro patológico que pode variar, de uma lesão inflamatória inicial a uma fase avançada também denominada de fase destrutiva representando a transição da gengivite para a periodontite, considerando-se as vias de atuação dos micro-organismos envolvendo mecanismos de regulação celulares e moleculares que ativam as células e sistemas do hospedeiro (DENTINO *et al.*, 2013).

A periodontite é a doença inflamatória polimicrobiana que surge devido à ruptura do equilíbrio ecológico (homeostasia) entre o microbioma periodontal e seu

hospedeiro. Sua etiopatogenia é complexa e multifatorial, caracterizada pela presença de infiltrado de leucócitos, perda de tecido conjuntivo, destruição do ligamento periodontal, reabsorção de osso alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsa periodontal, com a conseqüente perda dentária. A tríade do complexo vermelho que compreende as bactérias anaeróbias *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* tem sido tradicionalmente considerada o agente causal da periodontite, baseado em suas propriedades relacionadas à virulência e forte associação aos sítios da doença (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Entretanto, avanços recentes no sequenciamento de DNA (ácido desoxirribonucleico) e tecnologias de bioinformática possibilitaram maior resolução na identificação da composição da comunidade bacteriana e observaram que, apesar da correlação das espécies bacterianas específicas, novas cepas foram identificadas como fortemente associadas à periodontite e bastante prevalentes, como por exemplo, *Filifactor alocis* (GRIFFEN *et al.*, 2012). Em contraste com uma visão anterior de que o microbioma oral consiste em um grande número de espécies não cultivadas (PASTER *et al.*, 2001), a maioria das seqüências pode ser mapeada para espécies cultivadas (com um limiar de identidade de 98%). Surpreendentemente, o número de espécies identificadas em um único indivíduo com periodontite variou entre 100 e 300, e um total de 692 espécies foram detectadas em sítios subgingivais de pacientes saudáveis e com periodontite (GRIFFEN *et al.*, 2012).

Dados de estudos metagenômicos têm sugerido a ideia que um desequilíbrio no microbioma oral pode ser o mediador de um processo inflamatório não somente local restrito aos tecidos periodontais, mas também sistêmico, por meio da resposta do hospedeiro à possível bacteremia transitória e dos mediadores inflamatórios do periodonto que se difundem no organismo. No entanto, a intensidade da resposta inflamatória dependerá mais do sistema imunológico do hospedeiro individual do que simplesmente a quantidade e a composição microbiana da placa dental. Portanto, a via imuno inflamatória é o alvo mais importante para a terapia periodontal (ABUSLEME *et al.*, 2013; HAJISHENGALLIS, 2014a).

A periodontite crônica é uma das formas mais comuns de doença periodontal caracterizada pelo desenvolvimento de um processo inflamatório lento que afeta o periodonto de sustentação, na presença de biofilme subgingival. O fator etiológico primário da periodontite é o efeito cumulativo da interação entre o desafio microbiano e a resposta imunológica do hospedeiro. A reação do periodonto frente à presença

microbiana e seus produtos envolve a geração de mediadores inflamatórios como citocinas pró e anti-inflamatórias, principalmente IL-1 β , TNF- α e IL-10, geração de mediadores inflamatórios lipídicos como as prostaglandinas (PGs), liberação de enzimas líticas, além do recrutamento de células inflamatórias e ativação de osteoclastos, formando a base do processo destrutivo da periodontite. As citocinas IL-1 β e TNF- α , são os mediadores pró-inflamatórios diretamente envolvidos na estimulação da reabsorção óssea, assim como as metaloproteinases de matriz (MMPs) liberadas pelos macrófagos, que induzem a proliferação de progenitores de células clásticas e, indiretamente, estimulam a ação de osteoclastos maduros (BALLI *et al.*, 2016; HANADA; YOSHIMURA, 2002). A destruição de componentes da matriz extracelular tem sido atribuída à ação de MMPs que incluem collagenases derivadas de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos. A produção e liberação das MMPs são reguladas pela ativação gênica sob influência de fatores de virulência bacteriana e citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β (BALLI *et al.*, 2016; POZO *et al.*, 2005). Estas citocinas liberam MMPs por um mecanismo dependente de prostaglandina E₂ (PGE₂). As atividades das MMPs são controladas também por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular (BALLI *et al.*, 2016; GRAVES, 2008).

Os lipopolissacarídeos - LPS (endotoxinas) dos micro-organismos Gram-negativos são capazes de suscitar tanto uma resposta inflamatória quanto uma resposta imune, quando da sua interação com as células do hospedeiro. As respostas imunes aos micro-organismos são direcionadas, principalmente, contra as proteínas e os polissacarídeos da membrana externa, e contra as enzimas e toxinas liberadas fora da célula. A análise sugere que, em casos avançados de periodontite, os processos imunológicos desencadeados poderão, em princípio, sustentar o quadro inflamatório crônico em fases até posteriores à eliminação dos micro-organismos, conferindo um caráter imunopatológico à periodontite crônica. Fatores de risco, tais como diabetes, fumo e suscetibilidade genética podem predispor ou agravar a perda de inserção periodontal (FORD; GAMONAL; SEYMOUR, 2010).

Uma dificuldade importante no planejamento e desenvolvimento de uma intervenção eficaz para a prevenção da doença periodontal é a multiplicidade de patógenos periodontais suspeitos. O uso de antibióticos sistêmicos adjuntos à instrumentação mecânica, principalmente o uso combinado de amoxicilina e

metronidazol, tem demonstrado resultados clínicos superiores e mais persistentes em relação ao tratamento periodontal convencional em pacientes com periodontite (SANTOS *et al.*, 2016). No entanto, não há na literatura um esquema posológico padrão que oriente o uso dos antibióticos sistêmicos. Em razão da diversidade de medicamentos disponíveis para as abordagens terapêuticas antimicrobianas, a escolha adequada do fármaco, a dosagem apropriada, o momento ideal de iniciar a terapia medicamentosa e o tempo de duração do tratamento são quesitos a serem considerados. Ademais, o uso prolongado e /ou indiscriminado de antibióticos pode favorecer o surgimento de infecções secundárias como a candidíase e resistência antimicrobiana (FRITOLI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Embora se obtenha o sucesso na erradicação de uma espécie ou cepa microbiana, outros membros da extensiva flora podem substituí-la, desempenhando o seu papel no processo patogênico, uma vez que os micro-organismos são capazes de produzir uma variedade de substâncias que causam danos ao hospedeiro, direta ou indiretamente. O efeito prejudicial mais importante pode ser da própria resposta imune do hospedeiro aos antígenos apresentados pelos micro-organismos (GARLET, 2010).

Estudos pré-clínicos avaliando o uso de substâncias farmacologicamente ativas com potencial atividade moduladora sistêmica, dentre elas, propriedades anti-inflamatórias, antirreabsortivas e antioxidantes têm demonstrado resultados significativos na contenção dos processos destrutivos da periodontite crônica (GOKHALE; PADHYE, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2013b; GOES *et al.*, 2010; ÖZDEM *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2017; VERZELETTI, *et al.*, 2007). Concomitantemente, produtos naturais vêm sendo estudados no intuito de verificar suas características anti-inflamatórias e a sua ação no processo destrutivo do periodonto (GUIMARÃES *et al.*, 2016; HATIPOGLU *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017; PIMENTEL *et al.*, 2012; SAGLAM *et al.*, 2015; SEZER *et al.*, 2013; TOMOFUJI *et al.*, 2009a).

2.2.1 Periodontite e Citocinas

As citocinas são moléculas de regulação solúveis de baixo peso molecular, expressas como proteínas de membrana ou secretadas, que se ligam a receptores específicos e agem como mensageiras transmitindo sinais para outras células. Elas realizam numerosas ações que incluem a iniciação e a manutenção das respostas

imune e inflamatória e a regulação do crescimento e diferenciação celular. São produzidas por células residentes como as células epiteliais e fibroblastos, também por neutrófilos e macrófagos nas fases aguda e crônica da inflamação, e por linfócitos. Estas moléculas são liberadas em pequenas quantidades e suas funções se sobrepõem e são encadeadas, formando uma rede ativa que controla a resposta do hospedeiro.

O controle da liberação e da ação das citocinas é complexo e envolve inibidores e receptores geralmente dependentes da ativação do fator nuclear de transcrição kappa-B (NF-kB) (GOKHALE; PADHYE, 2013). Nos desenhos experimentais de periodontite induzida por ligadura, as vias de sinalização dos mediadores inflamatórios envolvidos estão associadas à rápida e transitória ativação de proteínas quinase de regulação extracelular (ERK) e proteínas quinase ativadas por mitógenos p38 (MAPK), bem como do fator nuclear kappa B (NF-kB), além da ativação do Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição (STAT)-3 e (STAT)-5 (GARCIA DE AQUINO *et al.*, 2009). Muitas citocinas são capazes de atuar de maneira autócrina e parácrina, agindo sobre a célula que as produziu, auto estimulando sua própria produção e a produção de outras citocinas (GARLET, 2010).

IL-1 β , IL-6 e TNF- α são as primeiras citocinas pró-inflamatórias a surgirem na resposta inata e agem diretamente na osteoclastogênese, estimulando a reabsorção óssea e inibindo sua formação (CEKICI *et al.*, 2014; GARLET, 2010). TNF- α possui múltiplas funções que vão desde o controle da migração de células à destruição tecidual. É capaz de estimular moléculas de adesão que promovem a aderência de neutrófilos às paredes dos vasos, levando ao extravasamento celular. Ativam a produção de IL-1 β e IL-6 e agem também estimulando a produção local de PGE₂, indução da secreção de metaloproteinases (MMP) e RANKL, levando à degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea (GRAVES *et al.*, 2011). IL-1 β e TNF- α também foram detectadas em tecido gengival clinicamente saudável. Como a periodontite e a gengivite são diferentes entidades da doença periodontal, esses achados sugerem que as citocinas inflamatórias por si só podem não explicar suficientemente a diferença na patogênese das diferentes formas de doença periodontal inflamatória crônica (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

Um importante aspecto a ser considerado está relacionado aos múltiplos níveis de regulação da síntese de citocinas. Os tipos e quantidades produzidas pelas células dependem de sua linhagem, estágio de diferenciação, estado de ativação e na

natureza do estímulo indutor. A maioria delas é sintetizada numa sequência convencional de sinais que resultam em sua translocação dentro do complexo de Golgi e rápida liberação, exceto IL-1 que não passa pelo retículo endoplasmático-complexo de Golgi (APTE; VORONOV, 2008; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Desde este início até a síntese final da proteína biologicamente ativa, há um grande número de mecanismos regulatórios que podem afetar a expressão gênica e a ativação das vias de sinalização que participam desses mecanismos. Diversas citocinas podem ser expressas por meio do RNA mensageiro (mRNA) mas isso não indica, necessariamente, que haverá atividade biológica, uma vez que podem se manter pré-armazenadas nos grânulos de mastócitos e eosinófilos. No caso, por exemplo, de IL-1 β , só será ativa em sua forma secretada (APTE; VORONOV, 2008; GARLET, 2010; MACKENZIE et al., 2001; YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que possuem um papel importante na migração de células fagocitárias para o sítio da infecção. São sintetizadas por uma variedade de células dentre elas as endoteliais, epiteliais e também leucócitos. Funcionalmente podem ser agrupadas em homeostáticas e inflamatórias. A interleucina 8 (IL-8) também denominada CXCL8 em humanos e CXCL1/CINC-1 em ratos, foi a primeira citocina identificada por sua atividade quimiotática. Ela pode ser detectada em tecidos periodontais saudáveis ou afetados pela doença periodontal e tem sido associada à inflamação subclínica composta por neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Possui papel importante no metabolismo ósseo, pois atua na diferenciação e atividade dos osteoclastos (BENDRE *et al.*, 2003).

2.2.2 Periodontite e Óxido Nítrico

Na periodontite, as bactérias e seus produtos interagem com o epitélio juncional, penetrando no tecido conjuntivo e induzindo a resposta inflamatória. O epitélio, devido a sua rápida taxa de renovação celular, deixa a superfície da mucosa constantemente exposta à colonização bacteriana resultando no recrutamento leucocitário (HAJISHENGALLIS, 2014a). Uma vez expostas aos produtos bacterianos, as células epiteliais passam a liberar mediadores inflamatórios como: fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) e óxido nítrico (NO) (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

O NO é um radical livre associado a múltiplas funções fisiológicas que incluem: a modulação do tônus e da integridade cardiovascular, regulação da agregação plaquetária, neurotransmissão e forte atividade oxidativa que contribui para a morte de micro-organismos. O NO é sintetizado a partir de L-arginina por um grupo de isoenzimas denominadas coletivamente NO sintase (NOS). As NOS existem como três isoformas distintas, as isoformas endoteliais (eNOS), as neuronais (nNOS) e as induzíveis (iNOS). eNOS e nNOS são constitutivamente expressos e liberam pequenas quantidades de NO durante um curto período de tempo. Em contraste, a via iNOS é principalmente regulada no nível da transcrição e sua ativação leva à produção de uma grande quantidade de NO por maiores períodos de tempo (KIECHLE; MALINSKI, 1993). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , bem como endotoxinas são potentes indutores de iNOS em uma grande variedade de tipos de células, enquanto que os glicocorticóides e as citocinas anti-inflamatórias, tais como, interleucina-4 (IL-4), IL-10 e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) suprimem a produção de NO (GADEK-MICHALSKA *et al.*, 2013; HERRERA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2016).

Os produtos microbianos associados à reação local inflamatória característica da periodontite são potentes indutores de síntese de NO. De fato, a inibição de síntese de NO reduz a reabsorção óssea em animais (LEITÃO *et al.*, 2005). Por outro lado, níveis baixos (basais) de NO parecem ser cruciais para o metabolismo dos osteoblastos. Embora a indução bacteriana de iNOS tenha sido demonstrada *in vitro*, o papel do NO na patogênese da periodontite não foi totalmente elucidado (MARIANO *et al.*, 2012; THOMAS; PULEO, 2011).

2.2.3 Periodontite e Espécies Reativas de Oxigênio

O estresse oxidativo é uma condição que descreve um estado potencialmente causado por radicais livres – produção excessiva de oxigênio livre proveniente da oxidação de substratos tais como açúcares, gorduras e proteínas glicadas. É decorrente de um desequilíbrio persistente entre a produção de espécies moleculares altamente reativas (oxigênio e nitrogênio) e defesas antioxidantes, levando a um dano celular. O oxigênio é necessário para a vida de todos os organismos vivos aeróbios uma vez que o utilizam na respiração celular mitocondrial, convertendo-o em água, por meio da sua redução sequencial. Esta conversão é incompleta e cerca de 1% do

oxigênio utilizado é liberado não como água, mas como espécies reativas de oxigênio (EROs ou “ROS - Reactive Oxygen Species”). Estas incluem os radicais de oxigênio e têm propriedades oxidantes no ambiente celular. A produção de EROs é um mecanismo de proteção essencial contra doenças associadas à infiltração fagocítica como a defesa do hospedeiro contra patógenos bacterianos. Como exemplo de ROS carregadas temos o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot), enquanto que para espécies não carregadas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DAHIYA *et al.*, 2013; TOMOFUJI *et al.*, 2009b).

Os radicais livres tentam ganhar estabilidade capturando um elétron adicional de estruturas moleculares à sua volta. A molécula doadora que perde um elétron neste processo de oxidação-redução é denominada oxidada e tem a capacidade de oxidar outras moléculas causando um dano às células vizinhas. Num primeiro momento, apenas características negativas foram atribuídas às EROs, sendo reconhecido o seu envolvimento na etiologia de muitas doenças, especialmente as associadas com o envelhecimento. O papel desempenhado pelas EROs é dependente da sua concentração, sendo que concentrações baixas têm uma função fisiológica. Enquanto que, concentrações elevadas originadas pelo estresse oxidativo são perigosas à manutenção da integridade celular. Sob condições normais, os compostos EROs são neutralizados na célula pela ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH Px), e também antioxidantes não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH) e vitaminas C e E (DAHIYA *et al.*, 2013; TRIVEDI; LAL, 2017).

Evidências crescentes indicam que a periodontite induz a produção excessiva de ROS no tecido periodontal. Estudos clínicos mostraram que a doença está correlacionada com o aumento da peroxidação lipídica no fluido crevicular gengival e na saliva (BALTACIOGLU *et al.*, 2014; TSAI *et al.*, 2005). Estudos em animais também demonstraram que a periodontite induziu dano molecular ao DNA em fibroblastos e aumentou os níveis de peróxido de hidrogênio em leucócitos polimorfonucleares (EKUNI *et al.*, 2008). Com a progressão da periodontite, as EROs produzidas como resultado da inflamação periodontal se difundem na corrente sanguínea provocando a oxidação de várias moléculas no sangue, levando ao estresse oxidativo circulante, que pode atingir gradualmente múltiplos órgãos. Portanto, o aumento do estresse oxidativo circulante induzido pela periodontite pode afetar negativamente a saúde sistêmica (TOMOFUJI *et al.*, 2007).

2.2.4 Modelos Animais utilizados na Periodontite

O desenvolvimento de pesquisas relacionadas à periodontite que objetivam desvendar a dinâmica fisiopatológica da doença, testar e validar as possíveis estratégias de reparação dos tecidos periodontais requer modelos animais apropriados e que complementem os experimentos *in vitro*. A seleção de um modelo experimental é determinada por seus objetivos e a capacidade laboratorial de abrigar animais de maior porte. Os modelos animais para estudo de patologias humanas possuem limitações inerentes à reprodutibilidade dos aspectos gerais das doenças. Entretanto, são considerados modelos que possuem inúmeras vantagens porque são capazes de simular condições relativas à complexidade do que ocorre em humanos, principalmente das inter-relações entre a resposta imune, o microbioma e os tecidos do hospedeiro por meio de uma relação de causa efeito (GRAVES *et al.*, 2011; HAJISHENGALLIS, 2014a). Nesse sentido, o uso de um modelo animal, no qual determinados parâmetros locais e sistêmicos possam ser estudados prospectivamente são bastante interessantes (HAJISHENGALLIS; LAMONT; GRAVES, 2015; OZ; PULEO, 2011).

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos utilizando modelos animais em que a periodontite pode ser induzida, reproduzida e facilmente mensurável. A doença pode ser dividida em fases específicas: (1) colonização; (2) invasão através do epitélio para o tecido conjuntivo; (3) estimulação de uma resposta inflamatória; (4) indução à ruptura do tecido conjuntivo e reabsorção óssea; (5) limitação da agressão pelo reparo do processo reabsortivo. As espécies mais utilizadas são primatas, cães, coelhos, porcos, ratos e hamsters. Contudo, é válido enfatizar que, independente da espécie usada, sempre os protocolos experimentais devem ser conduzidos assegurando-se os princípios éticos da experimentação envolvendo animais não humanos e as boas práticas em laboratório (GRAVES *et al.*, 2011; STRUILLLOU *et al.*, 2010).

Os roedores são os animais mais amplamente estudados nos experimentos pré-clínicos envolvendo patologias periodontais devido suas vantagens como o porte, menor custo, controle da idade e especificidades genéticas, além da microbiota controlável e facilidades de manipulação. Dentre os roedores, o rato (*Rattus norvegicus albinus*) é o mais adequado para estudos microbiológicos e imunológicos

(STRUILLOU *et al.*, 2010). Possui características anatômicas da junção dentoalveolar da região dos seus molares mais semelhantes com a descrita no homem, apesar da diferença na queratinização do epitélio crevicular (LISTGARTEN, 1975). A doença nessa espécie animal pode ser induzida de diversas formas, tais como, por meio de manipulação dietética (LALLAM-LAROYE *et al.*, 2006), através da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (HAJISHENGALLIS, 2014b) e, ainda, por meio da colocação de ligaduras na região cervical dos molares (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000).

Os achados clínicos e microscópicos da periodontite induzida em ratos são quase semelhantes àqueles observados no homem, com sangramento gengival e, microscopicamente, o epitélio juncional sofre alterações graduais como formação de cristas epiteliais, ulceração e migração apical. Observa-se ainda, no tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos, bem como destruição de fibras colágenas e atividade osteoclástica aumentada (HENNEMAN *et al.*, 2012).

Uma vez definido o método de indução da periodontite experimental, uma série de estudos pode ser realizada com relação à sua patogênese, evolução e terapêutica. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos utilizando um modelo experimental em ratos em que periodontite pode ser induzida, reproduzida e averiguada por meio da colocação de ligadura na cervical do segundo molar superior esquerdo (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2016). Neste modelo, a ligadura atua como um trauma mecânico sobre a área dento-gengival reduzindo assim a integridade do tecido, facilitando o acúmulo do biofilme dental e permitindo que haja interação entre biofilme polimicrobiano e hospedeiro, induzindo a perda óssea alveolar que tem início 3 dias após a indução, atingindo um máximo entre os dias 7 e 11, e declinando no dia 14. Entretanto, embora nesse modelo a perda óssea apresente uma redução aos 14 dias, o dano tissular é irreversível, comprometendo a fisiologia do sistema estomatognático (LIMA *et al.*, 2000).

Além disso, é válido enfatizar que vários trabalhos foram realizados com ratas fêmeas em que foi assegurada a reprodução do modelo, sugerindo, portanto, que o nível de estrogênio não afeta a quantidade de osso alveolar (AMADEI *et al.*, 2011; LEITÃO *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015). Nos últimos anos, nosso grupo vem realizando diversos estudos utilizando o modelo de periodontite em ratas (LEITÃO *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2012). Este modelo representa uma importante

estratégia para o estudo da fisiopatologia da reabsorção óssea *in vivo*, uma vez que é possível quantificar a perda óssea diretamente, permitindo avaliar os efeitos de ferramentas farmacológicas que possam interferir nesse processo destrutivo, contribuindo para a compreensão dos fenômenos inflamatórios envolvidos no mecanismo de lise óssea e a busca de tratamentos que possam alterar o curso evolutivo de doenças ósseas inflamatórias, como a periodontite (OZ; PULEO, 2011).

2.3 Plantas Medicinais

Desde os primórdios, o homem explora a natureza, principalmente plantas e animais, para se alimentar, medicar, construir abrigos e roupas. Durante séculos, as fontes de medicamentos eram inteiramente de origem natural, preparados, principalmente, a partir de ervas e plantas medicinais, constituindo a fonte mais antiga para o tratamento e a cura de doenças. Atualmente, com técnicas de separação e de identificação mais modernas, estes constituintes químicos são isolados, caracterizados, podendo ser muitas vezes modificados estruturalmente para alterar ou potencializar suas atividades biológicas (BRAZ-FILHO, 2010).

A Organização Mundial da Saúde supõe que 80% da população mundial, de algum modo, utilizam plantas medicinais como medicamentos. Estima-se, também, que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional. Entretanto, com o desconhecimento sobre a biodiversidade das florestas tropicais, como a da Amazônia, torna-se óbvio que o uso dos produtos naturais e plantas medicinais ainda é fragmentário e escasso. Cerca de 2/3 das espécies de plantas são encontradas nos trópicos. Como consequência, pode-se esperar que as potenciais descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos serão das florestas tropicais. Somente o Brasil possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora mundial, e não menos que 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas (WHO, 2011). Dentro dessa diversidade, pesquisas visando o uso farmacológico das plantas com potenciais efeitos terapêuticos têm sido difundidas no meio científico.

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na preparação da planta para uma formulação

específica, o que caracteriza um fitoterápico (WHO, 1998). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em sua resolução-rdc nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”. Neste último caso denomina-se fitofármaco, que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (BONATI, 1991; VASCONCELLOS *et al.*, 2002).

O uso de plantas medicinais em saúde preventiva e curativa é cercado de recomendações rigorosas quanto à utilização, pois muitas plantas têm mostrado efeitos adversos como irritação gástrica, lesões no sistema nervoso, hemorragias, irritação na mucosa bucal. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica com outras drogas ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (BRASIL, 2006, 2009; VASCONCELLOS *et al.*, 2002; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Na Europa, as plantas medicinais são utilizadas de forma ampla, como a Alemanha e a França, que detém 39 e 29% do total de vendas de toda a União Europeia, respectivamente. A legislação europeia tem sido ampliada por normas, como a que determina que o marketing de produtos relacionados a ervas medicinais só possa ser veiculado mediante autorização a ser fornecida, baseada nos resultados de testes que comprovem eficácia, qualidade e segurança. Com as regras mais restritivas, crescem as reclamações das empresas que comercializam ervas e plantas medicinais, para as quais os custos de estudos em animais e testes clínicos em humanos são quase proibitivos (SILANO *et al.*, 2004; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece resoluções que visam a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. A Resolução-RDC no. 48, de 16 de março de 2004, determina que todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos devem ser realizados em rede credenciada no sistema REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde) ou por empresas que possuam certificado de BPFC (Boas Práticas de Fabricação e Controle). Os fitoterápicos registrados antes de 31 de janeiro de 1995, com exceção daqueles já enquadrados como fitoterápicos tradicionais, devem apresentar, no primeiro protocolo de renovação, uma série de relatórios que atestem a segurança, eficácia e as normas de produção e controle de qualidade (BRASIL, 2004).

2.3.1 Família Plantaginaceae

Plantaginaceae é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor) pertencente à divisão: Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida e à ordem Lamiales. Atualmente abrange 92 gêneros e aproximadamente 1.855 espécies. Os gêneros mais diversos e numerosos são: Veronica com cerca de 450 espécies, seguida de Penstemon e Plantago com 275 espécies cada um, depois vem Bacopa e Stemodia com 55 espécies cada um. Adaptam-se muito bem em várias regiões do planeta, porém são facilmente encontrados nas regiões temperadas, onde se desenvolvem melhor. São encontradas mais frequentemente sob a forma de arbustos ou ervas, já como plantas aquáticas são bem menos comuns (ALBACH; MEUDT; OXELMAN, 2005).

As espécies de Plantaginaceae são morfológicamente caracterizadas pelas suas folhas alternas, quando de cada nó sai apenas uma folha, simples ou compostas. As flores são bissexuais (quase não são encontradas flores unissexuais) e a corola tem cinco pétalas e pode ser bilabiada quando o limbo é dividido em dois lábios (o inferior terá três pétalas e o superior duas), ou pode ser personada quando o lábio inferior está guarnecendo a abertura da corola. Os estames estão presentes em número de quatro, dois grandes e dois pequenos, podendo haver um quinto. Em alguns casos os estames estarão simplesmente reduzidos a um par. Os frutos das plantagináceas são do tipo cápsula septicida, que ao amadurecer rompem-se na linha de união dos carpelos para liberar as sementes. A polinização é feita por moscas, pássaros e abelhas (ALBACH; MEUDT; OXELMAN, 2005). A importância econômica fica por

conta de substâncias produzidas por algumas espécies que auxiliam no tratamento de doenças, como a leishmaniose e doenças cardíacas (RIBEIRO *et al.*, 2014; RUSSELL *et al.*, 2011).

2.3.2 Gênero *Stemodia* e Espécie *Stemodia maritima* Linn.

O gênero *Stemodia* é representado por cerca de 55 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. É um gênero de plantas de florescência, perenes com folhas dentadas e racemos de flores coloridas, que são geralmente, em tom roxo (HASSLER, 2017).

Stemodia maritima Linn é um arbusto perene que cresce amplamente na Região Nordeste do Brasil, próximo à costa marítima, onde é conhecida como “mastruz-bravo” ou “melosa” (Figura 4). Foi também identificada nas ilhas do Caribe onde é usada para tratar vários tipos de doenças. Dados da literatura sugerem ação antiviral, citotóxica e larvicida. Além disso, a população utiliza as folhas e caule para tratar dor de estômago e retenção de líquido, embora a literatura ainda careça de estudos que atestem a segurança dessa planta (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Figura 4. Foto de *Stemodia maritima* Linn.



Fonte: <https://goo.gl/qVSSEm>

Alguns constituintes foram isolados da *Stemodia maritima* Linn e incluem: esteróides, flavonóides e terpenos, principalmente diterpenos. O estudo químico das

folhas de *S. maritima* forneceu dois diterpenos do tipo estemodanos, sendo eles a estemodina e estemodinol, além da flavona jaceidina. O potencial efeito anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano de compostos isolados (estemodina, estemodinosídeo B e crenatosídeo) vem sendo testada por nosso grupo de pesquisa. O crenatosídeo (1.0 mg/mL e 0.005 mg/mL) obtido a partir das raízes de *S. maritima* apresentou atividade antioxidante comparável à da vitamina C, enquanto estemodinosídeo B exibiu atividade antimicrobiana sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria monocytogenes* (DA SILVA *et al.*, 2014). A identificação botânica desta espécie foi realizada pelo Professor Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do mesmo Departamento, sob o registro de nº 38.483 (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3 CAPÍTULOS

3.1 Artigo 1

Medicinal Plants and Ligature-Induced Periodontitis in Rats: A Systematic Review

Artigo submetido ao periódico *Archives of Oral Biology*
(Qualis B1 – Biotecnologia)

Medicinal Plants and Ligature-Induced Periodontitis in Rats: A Systematic Review

Alrieta Henrique Teixeira^{a,b*}, Jordânia Marques Freire^a, Isabela Rodrigues Pinto^a, Hellíada Vasconcelos Chaves^b, Mirna Marques Bezerra^{a, c}

^a Post-Graduation Program in Biotechnology, Renorbio, Federal University of Ceará, Brazil.

^b School of Dentistry, Federal University of Ceará, *Campus* Sobral, Ceará, Brazil.

^c School of Medicine, Federal University of Ceará, *Campus* Sobral, Ceará, Brazil.

Running title: Medicinal plants in experimental periodontitis in rats

*Correspondence should be addressed to Alrieta Henrique Teixeira: alrietaht@yahoo.com.br
Federal University of Ceará, Rua Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100, 62042-280,
Sobral, Ceará, Brazil.

Abstract

Background – Periodontitis is a chronic and progressive inflammatory disease characterized by intense inflammatory cell infiltrate, formation of periodontal pockets, loss of supporting tissues and alveolar bone resorption. Alternative and preventive options have become essential in order to overcome the adverse effects of both antimicrobial and anti-inflammatory agents used in large as adjunct to conventional mechanical and surgical treatments.

Objective - This systematic review aimed to verify the current scenario of studies employing medicinal plants in experimental treatment of periodontitis induced by ligature in rats.

Results – A systematic search was carried out using PubMed, PMC, SciELO and LILACS databases. Inclusion criteria were articles published between 2007 and 2017, in English language and those with similarity to the proposed theme. Forty-nine studies were in accordance with the search methodology. Data showed the use of a large variety of plant species or their derived compounds; different routes of administration and posology that resulted in significant biological effects on the periodontitis processes.

Conclusion – Medicinal plants would be a possible alternative coadjutant for the treatment of periodontitis.

Keywords: periodontitis; experimental periodontitis; animal model; rat; plants; medicinal plant.

1. Introduction

Current consensus defines periodontitis as a chronic inflammatory condition characterized by the loss of connective tissue, alveolar bone resorption, and formation of periodontal pockets as a result of the complex interaction between oral microbiome, immunoinflammatory host response, and environmental factors (Genco & Borgnakke, 2013; Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015).

The use of antimicrobials and anti-inflammatory agents is one of the clinical approaches employed to treat periodontitis. However, a current major concern of clinicians is the emergence of resistant microorganisms and the occurrence gastrointestinal toxicity. In an attempt to overcome these limitations, the search for newer and safer agents continues (Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015). In this regard, natural phytochemicals isolated from plants seem promising. In the recent years, the use of plant extracts, as well as other forms of medical treatments resurfaced and gained popularity (Alviano & Alviano, 2009; Chandra Shekar et al., 2015; Kala et al., 2015; Ramesh et al., 2016). The World Health Organization reports that about 80% of the worldwide population use herbal products for basic health care such as extracts, teas and other active principles (Who, 2011). Medicinal plants are preferred over conventional drugs due to wider biological activities, higher safety and lower costs (Ramesh et al., 2016).

Animal models may be considered a useful tool for testing and validating new therapies for damaged periodontal tissues (Graves et al., 2011; Hajishengallis, Lamont, & Graves, 2015). Particularly, rat models have been largely used to study periodontitis progression due to anatomical and histological similarities to those of humans. Further, they are considered a good strategy to immunology and microbiology research (Bezerra et al., 2002; Goes et al., 2010; Struillou et al., 2010).

Therefore, the aim of this study was to produce a qualitative systematic literature review, including a comprehensive search of all potentially relevant articles investigating the use of medicinal plants in pre-clinical trials for periodontitis using the experimental model by ligature in rats.

2. Methods

A careful systematic literature search was carried out to identify, select and critically appraise relevant articles related to the use of medicinal plants in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats.

MEDLINE (PubMed and PMC), SciELO and LILACS searches were performed using the combination of keywords: “periodontitis”; “induced periodontitis”; “ligature”; “plant”; “plant extracts” and “rats”. Inclusion criteria were articles published between 2007 and 2017, in English language and those with similarity to the proposed theme. Review articles, in vitro studies, articles without medicinal plants, non-English articles, studies using cell culture, and others without induced periodontitis in rats were excluded. Two researchers independently evaluated the methodological quality of each article selected. Four hundred and eleven articles found by the examiners were compared and assessed for relevance to the subject after the exclusion of the duplicates. Forty-nine articles were in accordance with the established criteria. Figure 1 depicts a schematic representation of the search methodology used for the article selection.

3. Results and Discussion

The initial search resulted in four hundred and eleven papers identified, out of which fifty were duplicated and sixty-eight were eligible. Nineteen of these articles were excluded and all forty-nine papers suitable for this review are summarized in Table 1. Fifty-four different species of medicinal plants were reported. Eighteen derived compounds were analyzed and six of them were from unspecific plants. Six routes of administration were described including gavage (70.68%), topical application (17.24%), intraperitoneal injection (5.17%), subcutaneous injection (3.44%), inhalation (1.72%), and diet (1.72%). The time of induced periodontitis ranged from six hours (acute periodontitis) to fifty days being 11 days (20.68%) the most commonly time used. The treatment duration ranged from one minute (Botelho et al., 2016) to sixty days (Li et al., 2016). Both the route of administration and the treatment time may influence the natural product efficacy as they may interfere with the bioavailability required for the expected biological effects.

Placement of a ligature around the molar teeth of rats leads to the presence of inflammatory cells and biofilm accumulation beneath the ligature. It is worth mentioning that the ligature alone does not initiate significant gingival inflammation nor bone loss in gnotobiotic rats (Rovin, Costich, & Gordon, 1966). The second most diverse bacterial community in the body can be found in the mouth, where over 700 species may colonize both hard and soft surfaces. Various bacterial strains are associated with periodontitis in humans and they have been used in preclinical trials including *Porphyromonas gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* (Graves et al., 2011). Some authors carried out the inoculation of lipopolysaccharide (LPS) from strains of *P.*

gingivalis associating with ligature-induced periodontitis to accentuate alveolar bone loss (Bhattarai et al., 2016; Chang et al., 2014; Cheng et al., 2010; Li et al., 2016; Sun et al., 2016; Yang et al., 2014), but it should be kept in mind that the inoculated bacterium is not essentially responsible for periodontal bone loss since the introduction of exogenous bacteria may modify the host oral microbiome (Klausen, 1991). Only five studies verified antibacterial activity (Botelho et al., 2007; 2008; Cirano et al., 2016; Kang et al., 2016; Pimentel et al., 2012) and among them just one did not reach antimicrobial effects (Cirano et al., 2016). Topical gel of *Lippia sidoides* and *Myracrodrum urundeuva* isolated or combined (Botelho et al., 2007; 2008) as well as aqueous extracts of *Persicariae Rhizoma* (Kang et al., 2016) demonstrates significant decrease in the number of periodontal viable bacteria. The effects of *Cordia verbenacea* was effective only on *P. gingivalis* pathogens (Pimentel et al., 2012). Current understanding is that there is a fine line between harmless and opportunistic commensal bacteria that can stimulate the destruction of the periodontium (Graves et al., 2011).

The main parameters evaluated in this literature search are related with alveolar bone loss (ABL) and immunoinflammatory activity. Loss of periodontal attachment and alveolar bone resorption occur predictably in a 7-day period in the rat (Bezerra et al., 2002; Bezerra et al., 2000; V. Lima et al., 2004), although some experiments have been conducted for much longer periods of time (Benatti et al., 2012; Carmona et al., 2013; Napimoga et al., 2009; Zhou et al., 2013). In this regard, substantial alveolar bone loss originated on day 3 of periodontitis induction reached a maximum between days 7 and 11 (Bezerra et al., 2002; Bezerra et al., 2000; Struillou et al., 2010). Kuhr et al. (Kuhr et al., 2004) demonstrated that the greater bone loss was observed from day 1 to day 15, whereas on days 30 and 60 slighter increases in the bone loss were observed. The ligature-induced model in rats is found to be sensitive to some systemic effects, such as smoking, and could be a useful model in examining systemic diseases such as diabetes and cardiovascular disease (Mizutani et al., 2014; Özdem et al., 2017). Further, Oliveira and colleagues analyzed the biological effects of medicinal plants on induced periodontitis and obtained an overview of the association of medicinal plants and the murine model of periodontitis (Oliveira et al., 2016).

Thirty-nine studies, from the forty-five articles analyzing the modulated effect of medicinal plants on alveolar bone loss, obtained a significant reduction of such parameter. Seven studies did not reach statistical reduction when the following plant species were tested: *Curcuma longa* (Guimarães et al., 2011), *Cannabis sativa* (Nogueira-Filho et al., 2011), *Ipoema alba* (Barrella et al., 2012), *Carapa guianensis* (Carmona et al., 2013), *Ocimum sanctum* (Hosadurga et al., 2015), and also eugenol (Pramod et al., 2016) and Piasclidine 300™ a

commercial phytotherapeutic medicament. Eugenol is a natural compound and when loaded in nanocapsules were capable to prevent septal bone resorption, but not on cemento-enamel junction (CEJ). Interestingly, studies using purified compounds from the same plant species Baicalin - *Scutellaria baicalensis* (Cai et al., 2008; Sun et al., 2016) and Curcumin - *Curcuma longa* (Corrêa et al., 2016; Guimarães et al., 2011) administered by the same route, only modifying the treatment time, observed different results. Sun et al. (Sun et al., 2016) observed that Baicalin at 100 or 200 mg/kg significantly reduced the values of CEJ and alveolar bone crest (ABC) measurements, while Cai et al. (Cai et al., 2008) analyzing the same concentrations only reached significant reduction using 200mg/kg. Curcumin at a dose of 100 mg/kg decrease alveolar bone loss when administrated daily for 30 days (Corrêa et al., 2016; Zhou et al., 2013) but not for 15 days (Guimarães et al., 2011). The main criteria used for assessing the benefits of plants to inhibit the immunoinflammatory process during periodontitis were the analysis of pro-and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-1- α , IL-17, IL-6, IL-4, IL-10, tumor necrosis factor (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), prostaglandin E2 (PGE2), myeloperoxidase (MPO) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Expression of immunomarkers has also been evaluated, such as nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B- α), nuclear factor- κ B (NF κ B), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), cyclooxygenase-2 (COX2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Both pro and anti-apoptotic signaling molecules were also analyzed (Bax and Bcl-2).

Natural phytochemicals are claimed to possess a better risk/benefit ratio. However, some constituents of medicinal plants may cause adverse effects. During this review, it was found few articles investigating toxicity assays (Barrella et al., 2012; Carvalho et al., 2009; Guimarães et al., 2016).

There are an increase number of research testing the medicinal plants biological effects but few systematic reviews addressing the use of medicinal plants in periodontitis and the most of already published on the proposed theme did not address, broadly and detailed, the studies already performed (Chandra Shekar et al., 2015; Karygianni et al., 2016; Prasad & Kunnaiah, 2014; Ramesh et al., 2016; Ravi & Divyashree, 2014). Our goal was to emphasize the most extensively studied rodent model for the induction of periodontitis and observed the effects of various treatments. The ligature-induced periodontitis model in rats represents an important strategy for the study of the bone resorption in vivo, since it is possible to quantify the bone loss directly. It was also observed a favorable biological activity of the medicinal plants

concerning antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities that modulate the periodontitis progress.

4. Conclusion

The extensive range of research using medicinal plants in the treatment of periodontitis incited us to investigate these studies. In this systematic review we observed a diversity of plants and their compounds, different experimental designs, routes of administration, period of periodontitis induction and treatment time. However, few studies tested the plant toxicity. Most experiments attenuated alveolar bone loss, reducing immunoinflammatory parameters, and demonstrating antioxidant activity. Despite the model limitations, the ligature-induced periodontitis in rats is a satisfactory experimental resource that is scientifically accepted to study periodontitis diseases. Although many studies have shown the potential of medicinal plants as an alternative to conventional therapy, appropriate targeted pre-clinical trials are still needed to identify the mechanism of action of these natural products and their future clinical applications.

References

- Alviano, D. S., & Alviano, C. S. (2009). Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *10*(1), 106–121. <https://doi.org/10.2174/138920109787048607>
- Balli, U., Cetinkaya, B. O., Keles, G. C., Keles, Z. P., Guler, S., Sogut, M. U., & Erisgin, Z. (2016). Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol. *Journal of Periodontal and Implant Science*, *46*(2), 84–95. <https://doi.org/10.5051/jpis.2016.46.2.84>
- Barrella, G. E., Suffredini, I. B., Ribeiro, F. V., Cirano, F. R., & Pimentel, S. P. (2012). Evaluation of the effect of an organic extract obtained from *Ipomoea alba* L. on experimental periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research*, *26*(2), 158–164. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242012000200012>
- Benatti, B. B., Campos-Júnior, J. C., Silva-Filho, V. J., Alves, P. M., Rodrigues, I. R., Uber-Bucek, E., ... Napimoga, M. H. (2012). Effects of a *Mikania laevigata* extract on bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. *Journal of Applied Oral Science*, *20*(3), 340–346. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000300008>
- Bezerra, M. M., Brito, G. A. C., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. C. (2002). Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *35*(5), 613–616. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000500015>
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B. M., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. and, & Rocha, F. A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, *71*(6), 1009–14. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.1009>

- Bhattarai, G., Poudel, S. B., Kook, S. H., & Lee, J. C. (2016). Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomaterialia*, 29, 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.031>
- Botelho, M. A., Barros, G., Queiroz, D. B., Carvalho, C. F., Gouvea, J., Patrus, L., ... Araújo-Filho, I. (2016). Nanotechnology in Phytotherapy: Antiinflammatory Effect of a Nanostructured Thymol Gel from *Lippia sidoides* in Acute Periodontitis in Rats. *Phytotherapy Research*, 30(1), 152–159. <https://doi.org/10.1002/ptr.5516>
- Botelho, M. A., Rao, V. S., Montenegro, D., Bandeira, M. A. M., Fonseca, S. G. C., Nogueira, N. A. P., ... Brito, G. A. C. (2008). Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytotherapy Research*, 22(4), 442–449. <https://doi.org/10.1002/ptr.2325>
- Botelho, M., Rao, V., Carvalho, C., Bezerra-Filho, J., Fonseca, S., Vale, M., ... Brito, G. (2007). *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.010>
- Cai, X., Li, C., Du, G., & Cao, Z. (2008). Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 43(1), 14–21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.00989.x>
- Carmona, G. B., Teixeira, R. K. C., Brito, M. V. H., Pontes, F. S. C., Andrade, E. H. A., Fonseca, F. P., ... Carvalho, F. M. (2013). Effect of andiroba oil on periodontitis in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira Para Desenvolvimento Pesquisa Em Cirurgia*, 28(6), 430–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743680>
- Carvalho, R. R., Pellizzon, C. H., Justulin, L., Felisbino, S. L., Vilegas, W., Bruni, F., ... Hiruma-Lima, C. A. (2009). Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: Involvement of lipoxin A4, anti-chemotaxic action in leukocyte rolling. *Chemico-*

- Biological Interactions*, 179(2–3), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.041>
- Casati, M. Z., Algayer, C., Cardoso da Cruz, G., Ribeiro, F. V, Casarin, R. C. V, Pimentel, S. P., & Cirano, F. R. (2013). Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 84(10), e58-64. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120746>
- Chandra Shekar, B. R., Nagarajappa, R., Suma, S., & Thakur, R. (2015). Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy Reviews*, 9(18), 87–92. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.162101>
- Chang, C.-Y., Fu, E., Chiang, C.-Y., Chang, W.-J., Cheng, W.-C., & Tu, H.-P. (2014). Effect of Paeonol on Tissue Destruction in Experimental Periodontitis of Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 42(2), 361–374. <https://doi.org/10.1142/S0192415X14500244>
- Cheng, W. C., Huang, R. Y., Chiang, C. Y., Chen, J. K., Liu, C. H., Chu, C. L., & Fu, E. (2010). Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 45(6), 788–795. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01301.x>
- Chin, Y. T., Hsieh, M. T., Lin, C. Y., Kuo, P. J., Yang, Y. C. S. H., Shih, Y. J., ... Liu, L. F. (2016). 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β--glucoside isolated from *Polygoni Multiflori* ameliorates the development of periodontitis. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6953459>
- Cho, A. R., Kim, J. H., Lee, D. E., Lee, J. S., Jung, U. W., Bak, E. J., ... Choi, S. H. (2013). The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 48(6), 781–789. <https://doi.org/10.1111/jre.12071>
- Choi, E.-Y., Bae, S. H., Ha, M. H., Choe, S.-H., Hyeon, J.-Y., Choi, J.-I., ... Kim, S.-J. (2016).

- Genistein suppresses *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages and attenuates alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 62, 70–79.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.11.019>
- Cirano, F. R., Casarin, R. C. V., Ribeiro, F. V., Casati, M. Z., Pimentel, S. P., Taiete, T., & Bernardi, M. M. (2016). Effect of Resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research*, 30(1), e128.
<https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0128>
- Corrêa, M. G., Pires, P. R., Ribeiro, F. V., Pimentel, S. Z., Casarin, R. C. V., Cirano, F. R., ... Casati, M. Z. (2016). Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, (April).
<https://doi.org/10.1111/jre.12382>
- Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000, 62(1), 59–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>
- Goes, P., Lima, A. P. S., Melo, I. M., Rêgo, R. O. C. C., & Lima, V. (2010). Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. *Brazilian Dental Journal*, 21(3), 193–198. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402010000300003>
- Graves, D. T., Kang, J., Andriankaja, O., Wada, K., & Rossa Jr, C. (2011). Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In *Frontiers of Oral Biology* (Vol. 15, pp. 117–132). <https://doi.org/10.1159/000329675>
- Guimarães, M. R., Coimbra, L. S., De Aquino, S. G., Spolidorio, L. C., Kirkwood, K. L., & Rossa, C. (2011). Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 269–279.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01342.x>
- Guimarães, M. V., Melo, I. M., Adriano Araújo, V. M., Tenazoa Wong, D. V., Roriz Fonteles,

- C. S., Moreira Leal, L. K. A., ... Lima, V. (2016). Dry Extract of *Matricaria recutita* L. (Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . *Journal of Periodontology*, *87*(6), 706–715. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150411>
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J., & Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*, *6*(3), 229–35. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.990806>
- Hatipoglu, M., Saglam, M., Köseoglu, S., Köksal, E., Keleş, A., & Esen, H. H. (2015). The effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber. (Hawthorn) extract administration in preventing alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128134>
- Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 615486. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>
- Holanda Pinto, S. A., Pinto, L. M. S., Cunha, G. M. A., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, *16*(1), 48–52. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-1609-x>
- Hosadurga, R. R., Rao, S. N., Edavanputhalath, R., Jose, J., Rompicharla, N. C., Shakil, M., & Raju, S. (2015). Evaluation of the efficacy of 2% *Ocimum sanctum* gel in the treatment of experimental periodontitis. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, *5*(1), 35–42. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.147231>
- Kala, B. S., Gunjan, C., Disha, N., & Shobha, P. (2015). Treatment of periodontal disease - A herbal approach. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *33*(2), 126–136.

- Kang, S. J., Lee, E. K., Han, C. H., Lee, B. H., Lee, Y. J., & Ku, S. K. (2016). Inhibitory effects of *Persicariae Rhizoma* aqueous extracts on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *12*(3), 1563–1571. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3499>
- Karygianni, L., Al-Ahmad, A., Argyropoulou, A., Hellwig, E., Anderson, A. C., & Skaltsounis, A. L. (2016). Natural antimicrobials and oral microorganisms: A systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01529>
- Kim, M. H., Choi, Y. Y., Lee, H. J., Lee, H., Park, J. C., & Yang, W. M. (2015). Topical application of herbal formula for the treatment of ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontal and Implant Science*, *45*(4), 145–151. <https://doi.org/10.5051/jpis.2015.45.4.145>
- Kim, M. H., Lee, H. J., Park, J.-C., Hong, J., & Yang, W. M. (2017). *Zanthoxylum piperitum* reversed alveolar bone loss of periodontitis via regulation of bone remodeling-related factors. *Journal of Ethnopharmacology*, *195*, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.057>
- Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *The Journal of Periodontology*, *62*, 59–73. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.1.59>
- Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C., & Kocher, T. (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, *39*(2), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00710.x>
- Li, J., Yang, H., Meng, S., Zhou, J., & Ding, Y. (2016). Metabonomic profiles reveal dose-dependent effects of Bu-Shen-Gu-Chi-Wan on the serum in experimental periodontitis of rat model. *Journal of Ethnopharmacology*, *193*, 248–254.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.051>

Lima, M. dos R., Lopes, A. P., Martins, C., Brito, G. A. C., Carneiro, V. C., & Goes, P. (2017).

The Effect of *Calendula officinalis* on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), 1–9.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00440>

Lima, V., Vidal, F. D. P., Rocha, F. A. C., Brito, G. A. C., & Ribeiro, R. A. (2004). Effects of

tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *Journal of Periodontology*, 75(1),

162–168. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.1.162>

Mizutani, K., Park, K., Mima, A., Katagiri, S., & King, G. L. (2014). Obesity-associated

Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. *Journal of Dental Research*,

93(6), 596–601. <https://doi.org/10.1177/0022034514532102>

Napimoga, M. H., Benatti, B. B., Lima, F. O., Alves, P. M., Campos, A. C., Pena-dos-Santos,

D. R., ... Guimarães, F. S. (2009). Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental

periodontitis in rats. *International Immunopharmacology*, 9(2), 216–222.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.11.010>

Nogueira-Filho, G. R., Todescan, S., Shah, A., Rosa, B. T., Tunes, U. da R., & Cesar Neto, J.

B. (2011). Impact of Cannabis Sativa (Marijuana) Smoke on Alveolar Bone Loss: A Histometric Study in Rats. *Journal of Periodontology*, 82(11), 1602–1607.

<https://doi.org/10.1902/jop.2011.100362>

Oliveira, G. J. P. L. de;, Paula, L. G. F. de;, Souza, J. A. C. de;, Spin-Neto, R., Stavropoulos,

A., & Marcantonio, R. A. C. (2017). Effects of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on the treatment of ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research*, 31(0),

1–11. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0028>

- Oliveira, J. S. de, Pinto, M. e S. C., Santana, L. de A. de B., Pinto, A. S. B., di Lenardo, D., & Vasconcelos, D. F. P. (2016). Biological Effects of Medicinal Plants on Induced Periodontitis: A Systematic Review. *International Journal of Dentistry*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/3719879>
- Özdem, M., Kırzioğlu, F. Y., Yılmaz, H. R., Vural, H., Fentoğlu, Ö., Uz, E., ... Yiğit, A. (2017). Antioxidant effects of melatonin in heart tissue after induction of experimental periodontitis in rats. *Journal of Oral Science*, 59(1), 23–29.
- Ozdemir, H., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozer, H., & Ay, S. (2012). Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: A morphometric and histopathological study. *Journal of Periodontal Research*, 47(1), 74–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01406.x>
- Ozden, F. O., Sakallioğlu, E. E., Sakallioğlu, U., Ayas, B., & Erisgin, Z. (2017). Effects of grape seed extract on periodontal disease: an experimental study in rats. *Journal of Applied Oral Science*, 25(2), 121–129. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0298>
- Paixão, M. S., Melo, M. S., Damascena, N. P., Araújo, A. A. S., Soares, A. F., Oliveira, D. V. A., ... Quintans-Júnior, L. J. (2015). Hyptis pectinata gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.12.002>
- Paola, R. D. I., Oteri, G., Mazzon, E., Crisafulli, C., Galuppo, M., Toso, R. D. A. L., ... Cuzzocrea, S. (2011). Effects of verbascoside, biotechnologically purified by *Syringa vulgaris* plant cell cultures, in a rodent model of periodontitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(5), 707–717. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01262.x>
- Paterniti, I., Briguglio, E., Mazzon, E., Galuppo, M., Oteri, G., Cordasco, G., & Cuzzocrea, S. (2010). Effects of *Hypericum Perforatum*, in a rodent model of periodontitis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 73. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10->

- Pimentel, S. P., Barrella, G. E., Casarin, R. C. V., Cirano, F. R., Casati, M. Z., Foglio, M. A., ... Ribeiro, F. V. (2012). Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*, 224. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-224>
- Pramod, K., Aji Alex, M. R., Singh, M., Dang, S., Ansari, S. H., & Ali, J. (2016). Eugenol nanocapsule for enhanced therapeutic activity against periodontal infections. *Journal of Drug Targeting*, *24*(1), 24–33. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1052071>
- Prasad, D., & Kunnaiah, R. (2014). *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *18*(4), 428–32. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.138678>
- Ramesh, A., Varghese, S. S., Doraiswamy, J. N., & Malaiappan, S. (2016). Herbs as an antioxidant arsenal for periodontal diseases. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *5*(1), 92–6. <https://doi.org/10.5455/jice.20160122065556>
- Ravi, K., & Divyashree, P. (2014). *Psidium guajava*: A review on its potential as an adjunct in treating periodontal disease. *Pharmacognosy Reviews*, *8*(16), 96–100. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.134233>
- Ribeiro, F. V., Barrella, G. E., Casarin, R. C. V., Cirano, F. R., Foglio, M. A., & Pimentel, S. P. (2012). Effect of crude extract and essential oil of *Cordia verbenacea* in experimental periodontitis in rats. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, *11*(1), 42–46.
- Rovin, S., Costich, E. R., & Gordon, H. A. (1966). The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *Journal of Periodontal Research*, *1*(3), 193–203. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01860.x>

- Saglam, M., Köseoglu, S., Hatipoglu, M., Esen, H. H., & Köksal, E. (2015). Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 23(1), 33–41. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140288>
- Sezer, U., Kara, M. İ., Erciyas, K., Özdemir, H., Üstün, K., Özer, H., & Göze, F. (2013). Protective effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(1), 38–44. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.650195>
- Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., & Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: a review. *The Open Dentistry Journal*, 4(April), 37–47. <https://doi.org/10.2174/1874210601004010037>
- Sun, J. Y., Li, D. L., Dong, Y., Zhu, C. H., Liu, J., Li, J. D., ... Zang, W. J. (2016). Baicalin inhibits toll-like receptor 2/4 expression and downstream signaling in rat experimental periodontitis. *International Immunopharmacology*, 36, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.012>
- Tamaki, N., Cristina Orihuela-Campos, R., Inagaki, Y., Fukui, M., Nagata, T., & Ito, H. O. (2014). Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.034>
- Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Endo, Y., Tamaki, N., ... Morita, M. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *The Journal of Periodontology*, 80(11), 1799–1808. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090270>
- Tu, H. P., Fu, M. M. J., Kuo, P. J., Chin, Y. T., Chiang, C. Y., Chung, C. L., & Fu, E. (2013).

- Berberine's effect on periodontal tissue degradation by matrix metalloproteinases: An in vitro and in vivo experiment. *Phytomedicine*, 20(13), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.001>
- Who. (2011). The World Medicines Situation 2011. Medicines prices, availability and affordability. *The World Medicines Situation*, 32. Retrieved from http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf
- Yang, H., Wen, Q., Xue, J., & Ding, Y. (2014). Alveolar bone regeneration potential of a traditional Chinese medicine, Bu-Shen-Gu-Chi-Wan, in experimental periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 49(3), 382–389. <https://doi.org/10.1111/jre.12117>
- Yang, X., Zhang, H., Wang, J., Zhang, Z., & Li, C. (2015). Puerarin decreases bone loss and collagen destruction in rats with ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 748–757. <https://doi.org/10.1111/jre.12261>
- Zheng, X., Mao, C., Qiao, H., Zhang, X., Yu, L., Wang, T., & Lu, E. (2017). Plumbagin suppresses chronic periodontitis in rats via down-regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(8), 1150–1160. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.19>
- Zhou, T., Chen, D., Li, Q., Sun, X., Song, Y., & Wang, C. (2013). Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(2), 349–356. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.682092>

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

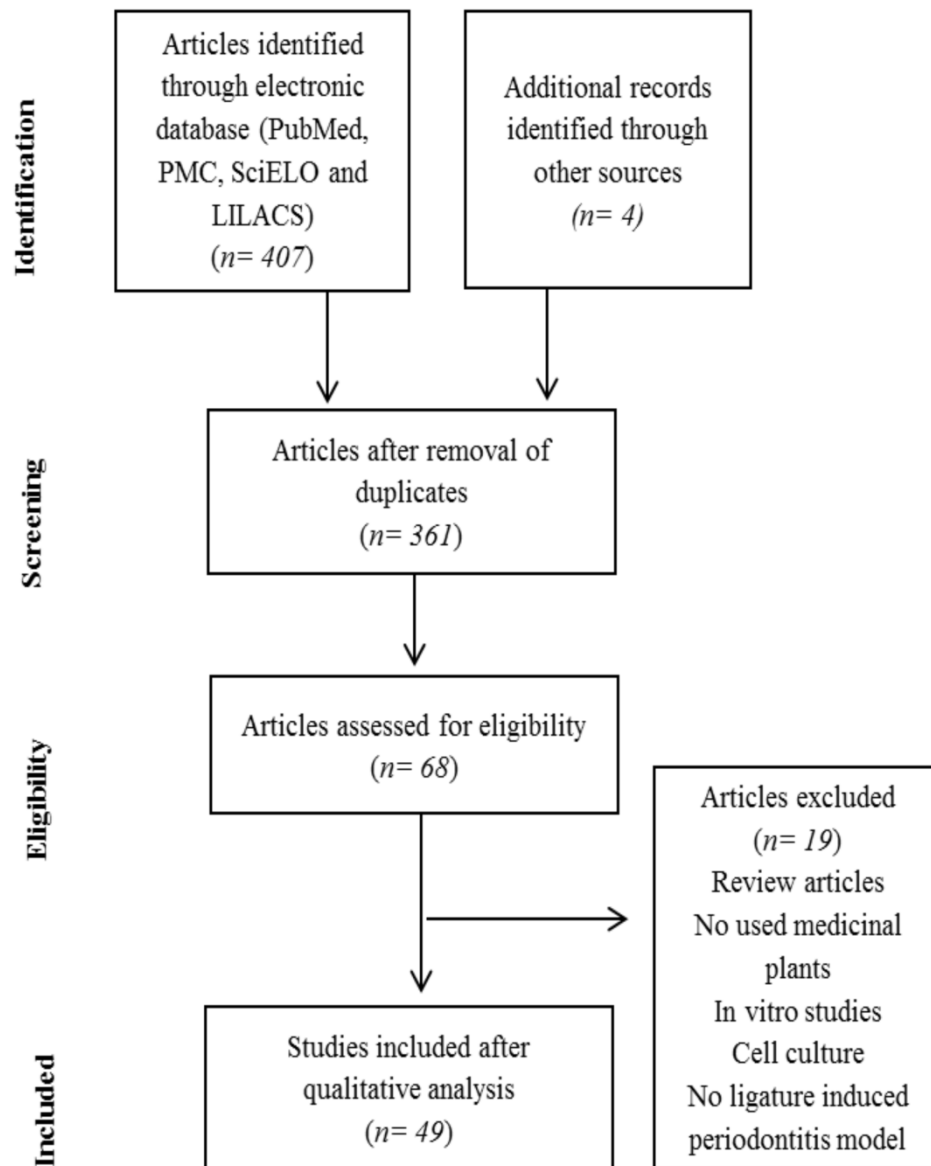


Figure 1: Schematic representation of the search methodology.

Table 1: List of studies searched in selected databases and main evaluated items.

References	Plant species or natural product	Route of administration (posology)/Treatment duration/ Induced periodontitis time	Main results
(Botelho et al., 2007)	<i>Lippia sidoides</i> and <i>Myracrodruon urundeuva</i>	Topical application (3times/d)/11d/11d	Reduced chronic and acute inflammatory cell influx, decreased MPO activity, TNF α and IL1 β levels. Presented antibacterial activity and reduced bone and cementum destruction.
(Holanda Pinto et al., 2008)	<i>Protium heptaphyllum</i> α - β -amyrin*	Gavage (one time 2 hours before induction of periodontitis)/26h/24h	Reduced MPO activity and TNF α levels in gingival tissues. Decrease TBARS formation.
(Botelho et al., 2008)	<i>Lippia sidoides</i> and <i>Myracrodruon urundeuva</i>	Topical application (3times/d)/11d/11d	Reduced MPO activity, decreased ABL and periodontal microorganisms.
(Cai et al., 2008)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Baicalin*	Gavage (1time/d)/8d/7d	Reduced ABL. Decrease expression of COX2 and iNOS.
(Tomofuji et al., 2009)	<i>Theobroma cacao</i>	Diet/28d/28d	Diminished periodontitis-induced oxidative stress. Decreased ABL and polymorphonuclear leukocyte infiltration.
(Carvalho et al., 2009)	<i>Mangifera indica</i> Mangiferin*	Gavage (1time/d)/ (2, 5 and 8d)/(1, 4 and 7d)	Reduced ABL. Decrease COX2. Maintained normal lipoxin A4 levels. Not interfere on MMP2 and MMP9. No toxicity effects.

(Napimoga et al., 2009)	<i>Cannabis sativa</i> Cannabidiol*	IP injection (1time/d)/30d/30d	Decrease ABL. Reduced RANKL/RANK expression. Decrease MPO, IL-1 β and TNF- α .
(Paterniti et al., 2010)	<i>Hypericum perforatum</i>	Intraperitoneal injection (1time/d)/8d/8d	Reduced the degree of inflammatory cell infiltration, decreased ABL. Reduced IL1 β and I κ B- α and increased NF- κ B. Attenuated the expression of iNOS. Upregulated proapoptotic Bax and downregulated antiapoptotic Bcl-2.
(Cheng et al., 2010)	Quercetin*	Gavage (1time/d)/(1, 5, 9 and 13d)/(0, 4, 8 and 12d)	Reduced ABL and inflammatory cell infiltration.
(Guimarães et al., 2011)	<i>Curcuma longa</i> Curcumin*	Gavage (1time/d)/15d/14d	No reduced ABL but reduced inflammation by the inhibition of IL-6, PGE2, and TNF α expression.
(Paola et al., 2011)	<i>Syringa vulgaris</i>	Gavage (1time/d)/8d/8d	Decreased MPO activity, iNOS expression, NF- κ B expression, ameliorating the tissue damage. Reduced ABL.
(Nogueira-Filho et al., 2011)	<i>Cannabis sativa</i>	Inhalation/(8min/d)/30d/30d	Increased bone loss in the furcation area of teeth with induced periodontitis.
(Benatti et al., 2012)	<i>Mikania laevigata</i>	Subcutaneous injection (1time/d)/30d/30d	Decrease alveolar bone loss by modulating the immune host response (lower expression of RANKL and decreased neutrophil migration).

(Barrella et al., 2012)	<i>Ipoema alba</i> L.	Topical application (1 time/d)/11d/11d	No reduction in the progression of ligature-induced periodontitis in rats. No toxicity.
(Pimentel et al., 2012)	<i>Cordia verbenacea</i>	Topical application (1time/d)/11d/11d	Reduced ABL. Decreased IL-1 α and increasing IL-10 levels. Reduced <i>P. gingivalis</i> detection.
(Ribeiro et al., 2012)	<i>Cordia verbenacea</i>	Gavage (3times/d)/11d/11d	Reduced ABL.
(Ozdemir et al., 2012)	<i>Nigella sativa</i> Thymoquinone*	Gavage (1 time/d)/11d/11d	Reduced ABL and the ratio of inflammatory cells and osteoclast number.
(Carmona et al., 2013)	<i>Carapa guianensis</i>	Gavage (1time/d)/7d/50d	Decreased the number of inflammatory cells. No reduction of alveolar bone loss.
(Sezer et al., 2013)	<i>Ginkgo biloba</i>	Gavage (1time/d)/11d/11d	Reduced ABL and osteoclast number.
(Tu et al., 2013)	Berberine*	Gavage (1time/d)/ 8d/8d	Attenuated ABL and reduced MMP2 and 9.
(Cho et al., 2013)	<i>Camellia sinensis</i> Epigallocatechin-3-gallate*	Gavage (1time/d)/(7, 14 and 28d)/7d	Decreased ABL. Downregulated TNF and IL-6 expression. Reduced osteoclast activity.
(Zhou et al., 2013)	<i>Curcuma longa</i> Curcumin*	Gavage (1time/d)/30d/30d	Decreased ABL suppressing RANK/RANKL/OPG expression. Reduced TNF- α and IL-6 expression.
(Casati et al., 2013)	Resveratrol*	Gavage (1time/d)/28d/11d	Reduced ABL and IL17 levels.

(Yang et al., 2014)	Bu-Shen-Gu-Chi-Wan TM (eighteen species)	Gavage (1time/d)/28d/28d	Reduced TNF- α , IL-1 β and osteocalcin in serum of inflammatory cell.
(Tamaki et al., 2014)	<i>Gnetum gnemon</i> L. Resveratrol*	Gavage (1time/d)/20d/21d	Reduced ABL. Decreased TNF- α , IL-1 β , IL-6 and iNOS mRNA expression. Activated Nrf2/antioxidant defense pathway in gingival tissue.
(Chang et al., 2014)	<i>Paeonia suffruticosa</i> Paeonol*	IP injection (1time/d)/8d/7d	Reduced the number of osteoclast and ABL. Decreased TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA expression.
(Saglam et al., 2015)	<i>Rhus coriaria</i> L.	Gavage (1time/d)/11d/11d	Reduced periodontal inflammation, alveolar bone loss, RANKL expression and increased OPG. Reduced oxidative stress index.
(Hatipoglu et al., 2015)	<i>Crataegus orientalis</i>	Gavage (1time/d)/11d/11d	Inhibitory effect on periodontal inflammation and alveolar bone loss in periodontal disease
(Paixão et al., 2015)	<i>Hyptis pectinata</i>	Topical application (3times/d)/11d/11d	Reduced alveolar bone loss.
(Hosadurga et al., 2015)	<i>Ocimum sanctum</i>	Topical application (1time/d)/6d/28d alternate	Anti-inflammatory effect resulting in a reduction of gingival inflammation and pocket depth. ABL was not statistically reduced.
(Kim et al., 2015)	<i>Angelica sinensis</i> , <i>Rehmannia glutinosa</i> ,	Topical application (1time/d)/14d/14d	Inhibited alveolar bone loss, decreased the number of osteoclast cells, prevented the

	<i>Angelica dahurica</i> , <i>Cimicifuga heracleifolia</i> and <i>Zanthoxylum</i> <i>piperitum</i> PerioH-035		destruction of periodontal tissues, and reduced the MMP-9 mRNA expression.
(Botelho et al., 2016)	<i>Lippia sidoides</i>	Topical application (1time/d) 1min/6h	Significant reduction in myeloperoxidase levels in gingival tissue.
(Yang et al., 2015)	Puerarin*	Gavage (1time/d)/8d/7d	Reduced ABL and inhibits the production of RANKL, TNF- α , IL-1 β , MMP2 and 9.
(Pramod et al., 2016)	Eugenol*	Topical application (1time/d)/12d/14d	Prevent septal bone resorption but not reduced bone resorption on cemento-enamel junction.
(Bhattarai et al., 2016)	Resveratrol*	Subcutaneous injection (1time/d)/14d/14d	Inhibits ABL and osteoclast formation. Increased SOD activity. Reduced COX2, MMP2 e 9.
(Corrêa et al., 2016)	<i>Curcuma longa</i> (Curcumin*) and Resveratrol*	Gavage (1time/d)/30d/30d	Reduced ABL when these agents were added singly or in combination with one another. Curcumin alone did not modulate the expression of any cytokine.
(Chin et al., 2016)	<i>Polygonum multiflorum</i>	Gavage (1time/d)/8d/7d	Attenuated alveolar bone loss. Reduced TNF- α , IL-1 β , iNOS, and COX-2 mRNA

	THSH* (2,3,5,4'-tetrahydroxylstilbene-2-O- β -D-glucoside		expressions. Augmented HO-1 and Nrf2 levels.
(Balli et al., 2016)	Kaempferol*	Gavage/(5times/d) every two days during 10d/15d	Reduced MMP-1 and -8 levels and increased alveolar bone loss in furcation area.
(Sun et al., 2016)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Baicalin*	Gavage (1time/d)/28d/28d	Mitigated alveolar bone loss. Reduced TNF- α , IL-1 β and myeloperoxidase expression. Down-regulated TLR2 and TLR4/MyD88/NF κ B.
(Kang et al., 2016)	<i>Persicaria tinctoria</i> H. Gross	Gavage (1time/d)/10d/11d	Reduced the extent of the alveolar bone loss, the colony numbers of viable bacteria, MPO activities, TNF- α , IL-1 β and malondialdehyde gingival levels and iNOS activities.
(Cirano et al., 2016)	Resveratrol*	Gavage (1time/d)/30d/11d	Alveolar bone loss and inflammatory parameters were not evaluated. No promotion of additional benefits on pathogens reduction.
(Guimarães et al., 2016)	<i>Matricaria recutita</i> L.	Gavage (1time/d)/11d/11d	Reduced ABL and furcation lesions. Not prevent reduction of bone alkaline phosphatase. Reduced leukocyte infiltration, TNF- α , IL-1 β levels and MPO activity. No toxicity effects.

(Kim et al., 2017)	<i>Zanthoxylum piperitum</i> PerioH-ZP050	Topical application (1time/d) 14d/14d	Decreased ABL. Inhibited osteoclast activity. Promoted osteoblast proliferation.
(Choi et al., 2016)	<i>Glycine max</i> L. Genistein*	IP injection (1time/d)/14d/14d	Decreased ABL.
(Li et al., 2016)	Bu-Shen-Gu-Chi-Wan™ (eighteen species)	Gavage/60d/21d	Regulated metabolic level of relevant immune factors (HDL and lipid, arginine, pyruvate/oxaloacetate, citric acid and acetoactic acid).
(Oliveira et al., 2017)	<i>Persea americana</i> Mill. and <i>Glycine max</i> L. Piascledine 300™	Gavage (1time/d)/(7, 15 and 30d)/7d	No reduces ABL. No differences in expression levels of TNF- α , IL-1 β or IL-6 mRNA.
(Ozden et al., 2017)	<i>Vitis vinifera</i>	Gavage (1time/d)/(14, 42 and 54d)/28d	Reduced inflammatory cell number and osteoclast density. Increased IL-10 and TGF- β gingival levels.
(Lima et al., 2017)	<i>Calendula officinalis</i>	Gavage (1time/d)/11d/11d	Reduced ABL. Increased gingival GSH, SOD and CAT concentration and reduced MDA levels.
(Zheng et al., 2017)	<i>Plumbago zeylanica</i> L. Plumbagin*	IP injection (5times/week)/ 28d/28d	Decreased TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA expression. Inhibit MAPK, NF-kB and JAK/SAT signaling pathway. Decrease ABL.

* Natural compounds derived from plants.

ABL: alveolar bone loss; CAT: catalase; GSH: glutathione; HO-1: heme oxygenase-1; I κ B- α : Nuclear factor kappa B inhibitor alpha; JAK/SAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription MAPK: mitogen-activated protein kinase; MDA: malondialdehyde; MPO: myeloperoxidase; MyD88: Myeloid differentiation primary response 88; Nrf2: Nuclear factor-E2 related factor 2; SOD: superoxide dismutase.

3.2 Artigo 2

Stemodia maritima L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress and Bone Loss in a Rat Periodontitis Model

Artigo submetido ao periódico *Frontiers in Physiology*
(Qualis A1 – Biotecnologia)

***Stemodia maritima* L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress and Bone Loss in a Rat Periodontitis Model**

***Stemodia maritima* modulates experimental periodontitis**

Alrieta Henrique Teixeira^{1,4}, Jordânia Marques de Oliveira Freire¹, Luzia Hermínia Teixeira de Sousa¹, Antônia Thaís Parente², Nayara Alves de Sousa², Angela Martha Campos Arriaga³, Francisca Renata Lopes da Silva³, Iracema Matos Melo⁴, Igor Iuco Castro da Silva⁴, Karuza Maria Alves Pereira⁵, Paula Goes⁶, José Jackson do Nascimento Costa⁷, Gerardo Cristino-Filho², Vicente de Paulo Teixeira Pinto², Hellíada Vasconcelos Chaves⁴, Mirna Marques Bezerra^{1,2*}

¹ Post Graduation Program in Biotechnology - RENORBIO – Ph.D. Program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

² Medical School, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil,

³ Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁴ Dentistry School, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

⁵ Department of Morphology, Medical School, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁶ Department of Pathology and Legal Medicine, Medical School, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁷ UNINTA University Center, Sobral, Brazil.

*Correspondence:

Mirna Marques Bezerra

mirnabrayner@gmail.com

Keywords: *Stemodia maritima* L., periodontitis, inflammation, oxidative stress, bone loss.

Abstract

Periodontitis is highly prevalent worldwide and is one of the major cause of tooth loss in adults. About 80% of the worldwide population use medicinal plants for their health care. *Stemodia maritima* L. (*S. maritima*) has demonstrated, *in vitro*, antioxidant and antimicrobial effects along with traditional use for inflamamatory conditions. Herein, it was assessed the potential therapeutic effect of *S. maritima* in rats subjected to experimental periodontitis (EP). EP was induced in female Wistar rats by nylon thread ligature around 2nd upper left molars for 11 days. Animals received (*per os*) *S. maritima* (0.2; 1 or 5 mg kg) or vehicle (saline+DMSO) 1 hour before ligature and then once daily for 11 days. Naive group experienced no manipulation. After this time-point, the animals were terminally anesthetized, the maxillae removed for morphometric and histological analyzes (H&E). Gingival tissues were dissected for cytokine dosages (TNF- α , IL1- β , CINC-1 and IL-10), enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) dosages, and gene expression (TNF- α , IL-1 β , RANK, and iNOS levels) by qRT-PCR. Systemic parameters (weight variation, serum levels of hepatic enzymes aspartate aminotransferase – AST and alanine aminotransferase – ALT, creatinine, total alkaline phosphatase - TALP, and bone alkaline phosphatase - BALP) were analyzed. Histological analyses of stomach, liver, kidney and heart was also performed. *S. maritima* (5 mg/kg) decreased alveolar bone loss, TNF- α and CINC-1 gingival levels, oxidative stress, and transcription of TNF- α , IL1- β , RANK and iNOS genes, while elevated both BALP activity and IL-10 gingival levels. Further, the animals did not show any signs of toxicity throughout the experimental time. In conclusion, *S. maritima* reduced alveolar bone loss, pro-inflammatory

50 cytokines production, and oxidative stress in a pre-clinical trial of periodontitis, representing a
51 new biotechnological tool for controlling periodontitis development.

52 **Introduction**

53 Current concepts defined periodontitis as a chronic inflammatory disease that compromises the
54 integrity of the tooth-supporting tissues involving an imbalance between the polymicrobial
55 biofilm and immune-inflammatory response, and also genetic and environmental risk factors
56 (Genco and Borgnakke, 2013; Hajishengallis, 2014). The periodontal tissue breakdown is
57 mainly mediated by the release of pro inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-8/CXCL8
58 (human chemokines) or CINC-1/CXCL1 (rat chemokines), and also the production of reactive
59 oxygen species (ROS) (Gomes et al., 2016; Hienz et al., 2015; Liao et al., 2014; Silva et al.,
60 2015).

61 Mechanical therapy and surgical procedures have been used to treat periodontitis (Wang
62 et al., 2014). Nevertheless, these procedures are not constantly satisfactory, and adjunctive
63 therapies may be necessary, such as the use of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory
64 drugs. Nevertheless, the major disadvantage of these agents is the development of bacterial
65 resistance and gastric/renal toxicity. In an attempt to overcome these limitations, the search for
66 newer and safer therapeutic agents still continues. Phytochemicals isolated from plants are
67 considered good alternatives to synthetic chemicals. In the recent years, the use of plant extracts
68 has gained popularity (Alviano and Alviano, 2009; Chandra Shekar et al., 2015; Kala et al.,
69 2015; Ramesh et al., 2016).

70 In this regard, earlier chemical studies on *Stemodia maritima* L. (Plantaginaceae family,
71 formerly Scrophulariaceae), which is used in traditional medicine for venereal disease, stomach
72 aches, edema, and swelling, reported the isolation of diterpenes, flavonoids, and other
73 compounds antiviral and larvicidal activities (Rodrigues et al., 2010; Russell et al., 2011). Our
74 research group performed a phytochemical study of *Stemodia maritima* L., and described the
75 isolation and structural elucidation of a new natural compound named stemodinol, along with
76 seven known compounds (da Silva et al., 2014). Furthermore, our group also demonstrated the
77 antioxidant and antimicrobial activities of stemodin, stemodinoside B, and crenatoside isolated
78 from *Stemodia maritima* L. (da Silva et al., 2014). Therefore, considering both periodontitis
79 seems to be associated with increased oxidative stress parameter levels and the potential
80 therapeutic effect of *Stemodia maritima* L., the aim of the present study was to assess the effects
81 of *Stemodia maritima* L. aqueous extract in a rat periodontitis model.

82 **Material and methods**

83 **Plant material**

84 *Stemodia maritima* L. (*S. maritima*) is a very common shrub that grows widely in the northeast
85 region of Brazil, near the seacoasts. It belongs to Plantaginaceae family, tribe Gratiioleae Benth
86 (Albach et al., 2005). The plant was identified by Dr. F. S. Cavalcanti and Prof. E. P. Nunes
87 from the Herbário Prisco Bezerra (EAC), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, where
88 a voucher specimen (# 38483) is deposited. For this study, we used aqueous extract obtained
89 from fresh leaves of Sm collected during the flowering stage along Fleixeiras Beach, Ceará,
90 Brazil (da Silva et al., 2014).

91 **Animals**

92 All animal experiment procedures and treatment performed in this study were approved by the
93 Animal Research Ethics Committee of Federal University of Ceará (Permit number: 08/2013)
94 in accordance with the guidelines from the Brazilian Society of Laboratory Animal Science -
95 SBCAL/COBEA). Female Wistar rats weighting 200 \pm 20 g were housed in polypropylene cages

96 and maintained on a 12 h-12 h light-dark cycles with a constant room temperature of 25°C and
97 received water and food *ad libitum*.

98 **Experimental design**

99 At first time thirty animals were randomly divided into five specific groups ($n = 6$ in each
100 group): unchallenged group (naive), three experimental periodontitis-challenged groups (EP)
101 receiving oral gavage (*per os*) in different concentrations of *S. maritima* (0.2, 1, or 5 mg/kg) or
102 0.9% saline solution + DMSO (vehicle). Experimental Periodontitis (EP) was performed as
103 previously described (Bezerra et al., 2002). Briefly, the animals were anesthetized with
104 ketamine and xylazine (90:10 mg/kg, i.p.) and a sterilized nylon suture thread (3.0 Nylpoint,
105 Ceará, Brazil) was placed around the cervix of the second left maxillary molar. Prior to the
106 thread passage, a guide through the medial and distal interproximal spaces was used to facilitate
107 suture placement. Groups received vehicle and *S. maritima* (*per os*) 1 hour before periodontitis
108 induction and once daily, for 11 days. After this time, blood samples were obtained, and the
109 animals were euthanized with an overdose of ketamine and xylazine (300:30mg/kg; i.p.). The
110 maxillae were removed to analyze the total bone resorption area. Sm at a dose of 5 mg/kg was
111 found to be the most effective dose against ABL, and therefore this dose was chosen for the
112 experiments. Hystopathological analyses was performed with the same above designed groups
113 ($n = 30$).

114 Subsequent series of experiments were conducted with the following groups: non-
115 ligated (naive - animals not subjected to EP); ligature only (vehicle), and ligature plus treatment
116 with *S. maritima* 5 mg/kg diluted in 0.9% saline solution + DMSO (*S. maritima* 5) to
117 quantification of gingival levels of cytokines TNF- α , IL-1 β , CINC-1 and IL-10 ($n = 18$),
118 antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) ($n = 18$) and quantitative
119 PCR analysis of TNF- α , IL-1 β , RANK, and iNOS ($n = 18$). All these assays were performed
120 using the gingival tissues from surrounding maxillary left molars (the half of the maxillae with
121 ligature).

122 **Measurement of alveolar bone loss**

123 After 11 days of EP the maxillae were excised and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours.
124 Following, maxillae were divided in half (left – with ligature and right – without ligature),
125 defleshed and kept in 8% sodium hypochlorite during 4 hours (Pimentel et al., 2012). After
126 that, the specimens were washed in running water and stained with methylene blue (1%) to
127 differentiate bone from teeth. Then, hemi-maxillae were fixed in a piece of wax with their
128 occlusal planes parallel to the ground and long axes perpendicular to the camera and
129 photographed with a 6.1-megapixel digital camera (Canon® 60D). Digital images were
130 processed with ImageJ® software (National Institute of Health, Bethesda,MD, USA) for
131 measurement of ABL, as described previously (Kuhr et al., 2004). The area (mm^2)
132 corresponding to the exposed roots of the molars was calculated and subtracted from the
133 correspondent area (mm^2) of the normal right hemi-maxillae.

134 After defined the most effective dose, one sample of each group was scanned using a high
135 resolution microcomputed tomography (micro-CT) system (SkyScan 1174; Bruker-microCT,
136 Kontich, Belgic, 50 kV and 800 μA). Each specimen was scanned with acquisition of images
137 every 0.7°, filed in TIFF format, with resolution of 19.7 μm and saved on a hard disk. After
138 reconstruction of the images (NRecon v1.6.9; Bruker-microCT) 3D models were created with
139 help of CTAn v.1.12 program (Bruker-microCT).

140 **Histopathological analysis**

141 The half of the maxillae (the left one with ligature) were fixed in 10% neutral-buffer formalin
142 and demineralized in 10% formic acid. The specimens were dehydrated, embedded in paraffin,
143 and sectioned along the molars in a mesio-distal plane for hematoxylin and eosin (HE) staining.
144 Sections of 4µm thickness, corresponding to the area between the first and second molars where
145 ligatures had been placed, were evaluated. Parameters such as inflammatory cell influx and
146 alveolar bone and cementum integrity were analyzed under light microscopy using a 0 to 3
147 score grade (Leitão et al., 2005; Lima et al., 2000) as follows: score 0: absence of or only
148 discrete cellular infiltration (inflammatory cell infiltration is sparse and restricted to the region
149 of the marginal gingival), preserved alveolar process and cementum; score 1: moderate cellular
150 infiltration (inflammatory cellular infiltration present all over the insert gingival), some minor
151 alveolar process resorption and intact cementum; score 2: accentuated cellular infiltration
152 (inflammatory cellular infiltration present in both gingival and periodontal ligament),
153 accentuated degradation of the alveolar process, and partial destruction of cementum; score 3:
154 accentuated cellular infiltrate, complete resorption of the alveolar process and severe
155 destruction of cementum. Two examiners who were masked to the identity of samples
156 performed histologic evaluation.

157 **Plasma Bone Alkaline Phosphatase (BALP)**

158 Blood samples were collected from retro-orbital plexus under anesthesia with a mixture of
159 ketamine and xylazine (90:10 mg/kg; i.p.) on the 11th day in order to obtain plasma
160 concentration of alkaline phosphatase using the thermo-activation method, as previously
161 described (Whitby and Moss, 1975). The samples were heated up to 56°C for 10 minutes. Serum
162 levels of BALP (a thermosensitive isoform of the total alkaline phosphatase, TALP) were
163 calculated by subtracting the concentration of the heated alkaline phosphatase in serum from
164 the concentration of TALP in serum. The analysis was performed according to the
165 manufacturer's instructions (Labest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

166 **Quantification of cytokines gingival levels**

167 The gingivae surrounding maxillary left molars were removed on 11th day and stored at -80 °C.
168 These tissues were used to determine the concentrations of TNF-α, IL-1β, CINC-1 and IL-10
169 using specific commercially available kits (DuoSet Elisa kit, R&D Systems Inc., MN, USA).
170 The inflammatory mediator's levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay
171 (ELISA) using respective standard curves. Results were shown as picogram /ml (pg/ml). All
172 kits were used according manufacturer's instructions.

173 **Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) gingival levels**

174 The gingivae surrounding maxillary left molars were removed on 11th day and stored at -80 °C.
175 These tissues were used to evaluate the effect of *S. maritima* 5 mg/kg on the oxidative stress.
176 The SOD activity was assayed as described previously (Beauchamp and Fridovich, 1971). In a
177 dark room, the gingival samples were homogenized in 20 µl of ice-cold phosphate buffer at
178 15,000 G for 20 minutes. The supernatants were mixed with a solution comprised of phosphate
179 buffer (50 nM), EDTA (100 nM) and L-methionine (19.5 mM) in a pH of 7.8. Then, 150 µl of
180 a solution of riboflavin (10 nM) and nitro NBT (750 nM) was added and the mixture was
181 exposed to light (20 W) for 15 min. The absorbance of the samples was measured at 560 nm.
182 The results are expressed as grams of SOD per ml.

183 CAT activity has as principle the measurement of O₂ production rate and H₂O in
184 proportion of H₂O₂. Briefly, 20 µl of gingival homogenate was mixed with a solution comprised
185 of 3% H₂O₂ and Tris-HCl EDTA buffer (5 nM, pH 8.0). The absorbance at a 230 nm wavelength

186 was measure immediately and 6 minutes after preparing the samples (Maehly and Chance,
187 1954).

188 **Quantitative PCR analysis of TNF- α , IL-1 β , RANK, and iNOS levels**

189 The gingivae surrounding maxillary left molars were removed on 11th day and stored at -80 °C.
190 Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA
191 concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity
192 at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England). For each
193 sample, the RNA concentrations used to synthesize cDNA were adjusted to 1000 ng/mL. Before
194 the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then
195 cooled in ice. The reverse transcription was performed in a total volume of 20 mL composed
196 of 10 mL of sample RNA, 4 mL reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8 units RNAsin, 150
197 units of reverse transcriptase Superscript III, 0.036U random primers, 10mM DTT and 0.5mM
198 of each dNTP (Invitrogen). The mixture was incubated at 42°C for 1 h, subsequently at 80°C
199 for 5 min and finally stored at -20°C. The negative control was prepared under the same
200 conditions but without addition of reverse transcriptase.

201 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed to determine
202 the gingival levels of mRNA for TNF- α , IL1- β , RANK and iNOS. Each reaction in real time
203 (20 μ L) contained 10 μ L of SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK),
204 7,3 μ L of ultra-pure water, 1 μ L of cDNA and 0.5 μ M of each primer, and real-time PCR was
205 performed in StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Warrington, UK) thermocycler.
206 The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of
207 the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and
208 30 sec at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. The primers were designed by using
209 the PrimerQuest[®] Tool <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. The primers used in
210 this study are shown in **Table 1**. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
211 was used as endogenous control for normalization of messenger RNA expression. The
212 specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products.
213 Relative quantifications of mRNA were carried out using the comparative threshold (CT) cycle
214 method. The delta-delta-Ct method was used to transform the Ct values into normalized relative
215 expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

216 **Subchronic Toxicity Evaluation**

217 Body mass, organ weight alteration and biochemical and histopathological parameters were
218 evaluated in animals treated daily during 11 consecutive days with a single dose of *S. maritima*
219 5mg/kg and saline + DMSO. Peripheral blood samples were collected in order to obtain
220 biochemical analysis (aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)
221 levels and creatinine (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

222 After sacrificing the animals, the liver, kidney and heart were removed and weighted.
223 The stomach was also removed to histological analysis. The organs were fixed with formalin
224 and then dehydrated with increasing concentrations of ethanol and embedding in paraffin. The
225 blocs were sliced in 5 μ m thick sections, stained with hematoxylin-eosin (HE) and observed at
226 light microscope (Leica DM 2000, Wetzlar, Germany).

227 **Statistical analysis**

228 Normality tests were performed to analyze the data. Results are presented as means \pm standard
229 error (SEM) or as medians when appropriate. ANOVA followed by Tukey test or Games-
230 Howell test were used to compare means and Kruskal–Wallis and Dunn tests were used to

231 compare medians. $P < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using IBM
232 SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY or GraphPad Prism 6 software, San
233 Diego, CA, USA.

234 **Results**

235 **Alveolar bone loss and histopathological analysis**

236 No significant ABL was observed in naive group (**Figure 1** and **Figure 2A** and **B**). Data
237 indicated that *S. maritima* 5mg/kg was the most effective dose protecting against ABL. Gavage
238 (*per os*) administration of *S. maritima* 5mg/kg 1 hour before the placement of the ligature and
239 once daily for 11 days resulted in a significant ($P < 0.05$) inhibition of ABL (2.37 ± 0.53) (Fig 1
240 and Fig 2G, H), compared to the group that received the vehicle only (4.47 ± 0.22) (**Figure 1**
241 and **Figure 2D** and **E**).

242 Histopathologic analysis of the region between the first and second upper left molars of
243 animals subjected to experimental periodontitis (vehicle group) demonstrated accentuated
244 inflammatory cell infiltration, breakdown of alveolar bone, collagen fiber derangement within
245 the periodontal ligament, and resorption of cementum, receiving a median score of 3 (range 2
246 to 3) (**Table 2**). The periodontium of animals treated with *S. maritima* 5 mg/kg showed
247 preservation of the alveolar process and cementum, reduction of the inflammatory cell
248 infiltration, and partial preservation of collagen fibers of the periodontal ligament, receiving a
249 median score of 1 (range 1 to 2). These values were statistically different ($P < 0.05$), compared
250 with the vehicle group.

251 **Plasma Bone-specific Alkaline Phosphatase (BALP)**

252 Experimental periodontitis decreased BALP serum levels and the treatment with *S. maritima*
253 5mg/kg resulted in a significant increase in the BALP serum levels variation ($P < 0.05$), when
254 compared with the vehicle group (**Figure 3**).

255 **Effects of *S. maritima* on cytokines gingival levels**

256 Periodontitis challenge was associated with significant ($P < 0.05$) increase of pro-inflammatory
257 cytokines (TNF- α , IL-1 β , and CINC-1) in gingival tissue; at the same time it was observed a
258 significant ($P < 0.05$) decrease in gingival levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, when
259 compared to naive group. Treatment with Sm 5mg/kg significantly ($P < 0.05$) decreased TNF-
260 α and CINC-1 but no significant difference was observed in IL-1 β gingival levels; also, *S.*
261 *maritima* 5mg/kg increased IL-10 levels, when compared to vehicle treated group (**Figure 4A,**
262 **4B, 4C** and **4D**).

263 **Superoxide dismutase and catalase gingival levels**

264 In the present study periodontitis induction resulted in a significant ($P < 0.05$) reduction of SOD
265 and CAT levels in gingival tissue, when compared with naive group. *S. maritima* 5 mg/kg
266 significantly ($P < 0.05$) increased both markers for oxidative stress in gingival tissue, when
267 compared with vehicle group (**Figure 5A** and **5B**).

268 **Quantitative PCR analysis of TNF- α , IL-1 β , RANK and iNOS levels**

269 The vehicle groups showed significant increase in TNF- α (Fig 6A), IL-1 β (Fig 6B), RANK (Fig
270 6C) and iNOS (Fig 6D) mRNA expression, when compared with naive control group.

271 Administration of *S. maritima* 5 mg/kg significantly reduced mRNA expression in all
272 parameters evaluated compared to vehicle group (Figure 6).

273 Analysis of toxicity

274 The animals did not show any signs of systemic illness, adverse pharmacological events or
275 changes in behavior throughout the experimental period. *S. maritima* 5 mg/kg or vehicle did not
276 affect the animals' body mass or the wet weight of the livers, kidneys or hearts compared to the
277 naive control throughout the study period (Table 3). Gross necropsy findings did not show any
278 abnormalities. A single-dose of *S. maritima* (5 mg/kg) or vehicle (saline+DMSO) over 11
279 consecutive days had no significant histological alterations in the hepatic, renal parenchyma,
280 and cardiac tissue (Figure 7). The values obtained for ALT/AST and creatinine did not differ
281 from the control group.

282 Discussion

283 Ligature-induced periodontitis is a well-established animal model, and although they have some
284 limitations, the structure and organization of the periodontal tissues are similar to those of
285 humans. Further, rat models have less limitations than *in vitro* models, which cannot reproduce
286 the complexity of interaction involving oral biofilm, environmental factors, and the
287 immune/inflammatory host response (Hajishengallis et al., 2015; Oz and Puleo, 2011; Struillou
288 et al., 2010). In this model, ligature causes a mechanical trauma on the dentogingival area,
289 thereby affecting tissue integrity, inducing inflammatory response, increasing oxidative stress,
290 destruction of periodontal ligament, and significant bone loss (Bezerra et al., 2000; Guimarães
291 et al., 2016; Lima et al., 2017; Oliveira et al., 2017).

292 *S. maritima* is a very common shrub that widely grows in Northeast Region of Brazil,
293 near the sea coast, where it is known as “*melosa*”. On the course of the phytochemical
294 investigation of *S. maritima*, our group reported previously both the structural elucidation and
295 composition of *S. maritima*, which includes steroids, flavonoids and terpenes (da Silva et al.,
296 2014; Rodrigues et al., 2010).

297 The protective effect of the *S. maritima* on alveolar bone loss was associated with an
298 increase in the level of plasma bone-specific alkaline phosphatase (BALP), a marker of
299 osteoblastic activity, suggesting that *S. maritima* 5mg/kg prevents bone resorption and also
300 stimulates bone formation. A huge amount of studies verified the medicinal plants effects on
301 ABL using similar periodontitis model (Guimarães et al., 2016; Hatipoglu et al., 2015; Saglam
302 et al., 2015; Sezer et al., 2013). Sezer et al. (Sezer et al., 2013) showed the systemic use of
303 *Ginko biloba* extract on reducing ABL. Hatipoglu et al. (Hatipoglu et al., 2015) assessed ABL
304 from microcomputed tomography (μ CT) images, and verified less bone resorption in animals
305 treated with *Crataegus orientalis* extracts. Recently, Guimarães et al. (Guimarães et al., 2016)
306 observed the ability of the *Matricaria recutita* extract to inhibit TNF- α and IL-1 β cytokines
307 and its influence preventing the osteoclast activation via RANKL-OPG. Also Lima et al. (Lima
308 et al., 2017) demonstrated anti-inflammatory and anti-oxidant activities performed by
309 *Calendula officinalis*.

310 Cytokines play a significant role in periodontitis. In the present work we demonstrated
311 that *S. maritima* (5 mg/kg) significantly increased IL-10 gingival levels, an anti-inflammatory
312 cytokine, while decreased the pro-inflammatory cytokines TNF- α and CINC-1; no significant
313 difference had been observed in IL-1 β gingival levels detected by ELISA. Alternative
314 therapeutic approaches based on inhibiting TNF- α production have been successfully used in
315 pre-clinical and clinical treatment of chronic inflammatory diseases, particularly rheumatoid
316 arthritis and temporomandibular joint (Alves et al., 2017; Araújo et al., 2013; Feldmann, 2002;
317 Freitas et al., 2016). Further, when mRNA expression for TNF- α , IL-1 β , iNOS, and RANK

318 were evaluated, it was observed that *S. maritima* 5 mg/kg significantly reduced mRNA
319 expression of all these genes, when compared to vehicle group. The involvement of cytokines
320 in periodontitis amplifying the inflammatory response has been largely demonstrated (Duarte
321 et al., 2015). Concerning the apparently contradictory result that *S. maritima* 5mg/kg reduced
322 mRNA expression for IL-1 β , without affecting IL-1 β gingival levels, we hypothesized that the
323 IL-1 β levels detected by ELISA in gingival samples might derive from a pre-formed pool, since
324 the increase in IL-1 β levels after periodontitis challenge precedes the increase in mRNA.
325 Studies analyzing the effects of resveratrol, a naturally occurring product found in numerous
326 plants, obtained similar results (Casati et al., 2013; Tamaki et al., 2014). A number of cytokines
327 are found pre-formed in the secretory granules of inflammatory cells, such as eosinophils and
328 mast cells, enabling their speedy release in response to different challenges (Kelso, 1998). In
329 this regard some authors have identified a pre-formed pool of IL-1 β in hypothalamic explants
330 from rats (Tringali et al., 1997). Further, IL-1 β is exclusively active in its secreted form (Apte
331 and Voronov, 2008), which may explain *S. maritima* anti-inflammatory effects, although it did
332 not reduce the detectable levels of IL-1 β . Lopez-Castejo and Brough (2011) suggested that the
333 secretion mechanisms of IL-1 β occurs on a continuum, dependent upon stimulus strength and
334 the extracellular IL-1 β requirement. Protected release of IL-1 β is based upon, firstly the
335 observation that bioactive IL-1 β can be found in shed microvesicles from the plasma membrane
336 and subsequently that it is also found in secreted exosomes (Lopez-Castejon and Brough, 2011).
337 Since IL-1 β has a very short half life in plasma, it makes sense to suggest that protected IL-1 β
338 is destined for sites distant to the inflammatory lesion. In ATP stimulated THP-1 cells there is,
339 in addition to microvesicle contained IL-1 β , vesicle free IL-1 β released into the supernatant
340 (MacKenzie et al., 2001).

341 Nitric oxide (NO) is a free radical gas and it is considered a biomarker during
342 inflammatory response (Gadek-Michalska et al., 2013). Pro-inflammatory cytokines such as
343 TNF- α and IL-1 trigger the transcription of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene
344 resulting in NO production (Gadek-Michalska et al., 2013). The release of large amounts of NO
345 by iNOS has been shown to play a major role in immune-inflammatory events, including
346 rheumatoid arthritis and periodontitis (Leitão et al., 2005; Martins et al., 2016; Tamaki et al.,
347 2014). It has been postulated that some components of medicinal plants might inhibit nuclear
348 transcription factor-kB binding activity and downregulating the expression of iNOS (Cai et al.,
349 2008; Kim et al., 2005) added to the significantly increase of IL-10 levels in gingival tissues
350 that could also promote the decrease of iNOS gene expression.

351 The regulation of the critical cytokines macrophage colony-stimulating factor, RANK
352 ligand, is essential to differentiation of osteoclasts. Also, our present results revealed that
353 ligature-induced periodontitis in rats is associated with increase in the RANK mRNA levels in
354 periodontal tissues. *S. maritima* (5 m/kg) was able to reduce RANK expression.

355 A great number of evidence indicates that oxidative stress plays a central role in
356 periodontitis hallmarks (Lima et al., 2017; Tóthová et al., 2015). In the present study we
357 demonstrated that ligature-induced periodontitis in rats leads to an oxidative stress, indicated
358 by a significant reduction of SOD and CAT levels in gingival tissue. This effect was statistically
359 reduced in animals from group treated with *S. maritima* (5 mg/kg), which suggests that the
360 beneficial effects of *S. maritima* is at least partially related to its antioxidative proprieties.
361 *Calendula officinalis* extract also presents ability to reduce oxidative stress by decreasing
362 malonaldeyde (MDA) levels and increasing reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase
363 (SOD) and catalase (CAT) enzymes from gingival tissue (Lima et al., 2017).

364 Medicinal plants have been historically used for innumerable human diseases treatment
365 due to provide bioactive molecules that promoted therapeutic benefits (Oliveira et al., 2016;
366 Ramesh et al., 2016; Varela-López et al., 2015). The population uses the leaves and stem of *S.*
367 *maritima* to treat stomach pain and fluid retention, although the literature still lacks studies that

368 attest the safety of this plant. Thus, in the present study we demonstrated by biochemical and
 369 histopathological analysis that the administration of *S. maritima* (5mg/kg) did not promoted any
 370 signs of toxicity when administered during 11 consecutive days.

371 This study observed that *S. maritima* 5mg/kg extract reduced alveolar bone loss,
 372 inflammation and oxidative stress in a ligature-induced model of periodontitis in rats, without
 373 causing systemic changes. These data are in accordance with previous results from our group
 374 where it was demonstrated *in vitro* assays that *S. maritima* has anti-inflammatory, antioxidant
 375 and antibacterial properties (da Silva et al., 2014). Furthermore, probing the mechanism of
 376 action underlying the protective effect of *S. maritima* in this animal model, we found evidence
 377 that, at least in part, its effectiveness depends upon a positive balance between pro and anti-
 378 inflammatory cytokines, decreasing TNF- α , IL-1 β , and CINC-1 gingival levels, and increasing
 379 IL-10 ones; this effect might also modulate both iNOS activity and RANK levels, improving
 380 antioxidative events.

381 To the best of our knowledge, this is the first report evaluating the efficacy of *S. maritima*
 382 in a pre-clinical trial of periodontitis in rats. Although we do agree that additional studies are
 383 still required, our present data suggest that *S. maritima* might represent a potential
 384 biotechnological tool for controlling periodontitis development.

385 References

386 Albach, D. C., Meudt, H. M., and Oxelman, B. (2005). Piecing together the “new”
 387 Plantaginaceae. *Am. J. Bot.* 92, 297–315. doi:10.3732/ajb.92.2.297.

388 Alves, S. M., Abreu, S. C., Lemos, J. C., Gomes, F. I. F., Alves, S. M., do Val, D. R., et al.
 389 (2017). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the
 390 zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend
 391 on TNF- α inhibition. *Pharmacol. Reports* 69, 764–772.
 392 doi:10.1016/j.pharep.2017.03.007.

393 Alviano, D. S., and Alviano, C. S. (2009). Plant extracts: search for new alternatives to treat
 394 microbial diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 106–121.
 395 doi:10.2174/138920109787048607.

396 Apte, R. N., and Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad “guy” in tumor
 397 immunobiology and immunotherapy? *Immunol. Rev.* 222, 222–241. doi:10.1111/j.1600-
 398 065X.2008.00615.x.

399 Araújo, A. A., Souza, T. O., Moura, L. M., Brito, G. A. C., Aragão, K. S., Araújo, L. S., et al.
 400 (2013). Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-
 401 2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J. Clin.*
 402 *Periodontol.* 40, 1104–1111. doi:10.1111/jcpe.12160.

403 Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay
 404 applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. doi:10.1016/0003-
 405 2697(71)90370-8.

406 Bezerra, M. M., Brito, G. A. C., Ribeiro, R. A., and Rocha, F. A. C. (2002). Low-dose
 407 doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*
 408 35, 613–616. doi:10.1590/S0100-879X2002000500015.

409 Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B. M., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. and, et

- 410 al. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in
411 experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.* 71, 1009–14.
412 doi:10.1902/jop.2000.71.6.1009.
- 413 Cai, X., Li, C., Du, G., and Cao, Z. (2008). Protective effects of baicalin on ligature-induced
414 periodontitis in rats. *J. Periodontal Res.* 43, 14–21. doi:10.1111/j.1600-
415 0765.2007.00989.x.
- 416 Casati, M. Z., Algayer, C., Cardoso da Cruz, G., Ribeiro, F. V., Casarin, R. C. V, Pimentel, S.
417 P., et al. (2013). Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels
418 of cytokines during periodontitis in rats. *J. Periodontol.* 84, e58-64.
419 doi:10.1902/jop.2013.120746.
- 420 Chandra Shekar, B. R., Nagarajappa, R., Suma, S., and Thakur, R. (2015). Herbal extracts in
421 oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacogn. Rev.*
422 9, 87–92. doi:10.4103/0973-7847.162101.
- 423 da Silva, F., Rodrigues, F., Gomes, A., Arriaga, A., Mafezoli, J., Lemos, T., et al. (2014).
424 Phytochemical study, antioxidant and antibacterial activities of *Stemodia maritima*. *Quim*
425 *Nov.* 37, 1474–1478. doi:http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140255.
- 426 Duarte, P. M., Bastos, M. F., Fermiano, D., Rabelo, C. C., Perez-Chaparro, P. J., Figueiredo, L.
427 C., et al. (2015). Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different
428 cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *J.*
429 *Periodontal Res.* 50, 18–27. doi:10.1111/jre.12180.
- 430 Feldmann, M. (2002). Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev.*
431 *Immunol.* 2, 364–371. doi:10.1038/nri802.
- 432 Freitas, R. S., do Val, D. R., Fernandes, M. E. F., Gomes, F. I. F., de Lacerda, J. T. J. G.,
433 SantiGadelha, T., et al. (2016). Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-
434 induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme
435 oxygenase-1 pathway integrity and tnf-alpha and il-1beta suppression. *Int.*
436 *Immunopharmacol.* 38, 313–323. doi:10.1016/j.intimp.2016.06.012.
- 437 Gadek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., and Bugajski, J. (2013). Cytokines,
438 prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacol.*
439 *Reports* 65, 1655–1662. doi:10.1016/S1734-1140(13)71527-5.
- 440 Genco, R. J., and Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontol.*
441 *2000* 62, 59–94. doi:10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x.
- 442 Gomes, F. I. F., Aragao, M. G. B., Barbosa, F. C. B., Bezerra, M. M., de Paulo Teixeira Pinto,
443 V., and Chaves, H. V. (2016). Inflammatory Cytokines Interleukin-1beta and Tumour
444 Necrosis Factor-alpha - Novel Biomarkers for the Detection of Periodontal Diseases: a
445 Literature Review. *J. oral Maxillofac. Res.* 7, e2. doi:10.5037/jomr.2016.7202.
- 446 Guimarães, M. V., Melo, I. M., Adriano Araújo, V. M., Tenazoa Wong, D. V., Roriz Fonteles,
447 C. S., Moreira Leal, L. K. A., et al. (2016). Dry Extract of *Matricaria recutita* L.
448 (Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition
449 of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . *J. Periodontol.* 87, 706–715.
450 doi:10.1902/jop.2016.150411.

- 451 Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones,
452 pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35, 3–11. doi:10.1016/j.it.2013.09.001.
- 453 Hajishengallis, G., Lamont, R. J., and Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal
454 models in understanding periodontal disease. *Virulence* 6, 229–35.
455 doi:10.4161/21505594.2014.990806.
- 456 Hatipoglu, M., Saglam, M., Köseoglu, S., Köksal, E., Keleş, A., and Esen, H. H. (2015). The
457 effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber. (Hawthorn) extract administration in
458 preventing alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. *PLoS One* 10, 1–11.
459 doi:10.1371/journal.pone.0128134.
- 460 Hienz, S. A., Paliwal, S., and Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in
461 Periodontitis. *J. Immunol. Res.* 2015, 615486. doi:10.1155/2015/615486.
- 462 Kala, B. S., Gunjan, C., Disha, N., and Shobha, P. (2015). Treatment of periodontal disease - A
463 herbal approach. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 33, 126–136.
- 464 Kelso, A. (1998). Cytokines: Principles and prospects. *Immunol. Cell Biol.* 76, 300–317.
465 doi:10.1046/j.1440-1711.1998.00757.x.
- 466 Kim, D. H., Cho, K. H., Moon, S. K., Kim, Y. S., Kim, D. H., Choi, J. S., et al. (2005).
467 Cytoprotective mechanism of baicalin against endothelial cell damage by peroxynitrite. *J.*
468 *Pharm. Pharmacol.* 57, 1581–90. doi:10.1211/jpp.57.12.0008.
- 469 Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C., and Kocher, T. (2004). Observations
470 on experimental marginal periodontitis in rats. *J. Periodontal Res.* 39, 101–106.
471 doi:10.1111/j.1600-0765.2004.00710.x.
- 472 Leitão, R. F. C., Ribeiro, R. A., Chaves, H. V., Rocha, F. A. C., Lima, V., and Brito, G. A. C.
473 (2005). Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Alveolar Bone Resorption in
474 Experimental Periodontitis in Rats. *J. Periodontol.* 76, 956–963.
475 doi:10.1902/jop.2005.76.6.956.
- 476 Liao, C. H., Fei, W., Shen, Z. H., Yin, M. P., and Lu, C. (2014). Expression and distribution of
477 TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pac. J. Trop.*
478 *Med.* 7, 412–416. doi:10.1016/S1995-7645(14)60067-5.
- 479 Lima, M. dos R., Lopes, A. P., Martins, C., Brito, G. A. C., Carneiro, V. C., and Goes, P. (2017).
480 The Effect of *Calendula officinalis* on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental
481 Periodontitis. *Front. Physiol.* 8, 1–9. doi:10.3389/fphys.2017.00440.
- 482 Lima, V., Bezerra, M. M., de Menezes Alencar, V. B., Vidal, F. D., da Rocha, F. a, de Castro
483 Brito, G. a, et al. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental
484 periodontal disease in rats. *Eur. J. Oral Sci.* 108, 123–129.
- 485 Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using
486 Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
487 doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 488 Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion.
489 *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.

- 490 MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A.
491 (2001). Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity* 15, 825–
492 835. doi:10.1016/S1074-7613(01)00229-1.
- 493 Maehly, A. C., and Chance, B. (1954). “The Assay of Catalases and Peroxidases,” in *Methods*
494 *of Biochemical Analysis*, 357–424. doi:10.1002/9780470110171.ch14.
- 495 Martins, C. S., Leitão, R. F. C., Costa, D. V. S., Melo, I. M., Santos, G. S., Lima, V., et al.
496 (2016). Topical HPMC/S-nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone
497 resorption in experimental periodontal disease in rats. *PLoS One* 11, 1–19.
498 doi:10.1371/journal.pone.0153716.
- 499 Oliveira, G. J. P. L. de;, Paula, L. G. F. de;, Souza, J. A. C. de;, Spin-Neto, R., Stavropoulos,
500 A., and Marcantonio, R. A. C. (2017). Effects of avocado/soybean unsaponifiables (ASU)
501 on the treatment of ligature-induced periodontitis in rats. *Braz. Oral Res.* 31, 1–11.
502 doi:10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0028.
- 503 Oliveira, J. S. de, Pinto, M. e S. C., Santana, L. de A. de B., Pinto, A. S. B., di Lenardo, D., and
504 Vasconcelos, D. F. P. (2016). Biological Effects of Medicinal Plants on Induced
505 Periodontitis: A Systematic Review. *Int. J. Dent.* 2016, 1–10. doi:10.1155/2016/3719879.
- 506 Oz, H. S., and Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *J. Biomed.*
507 *Biotechnol.* 2011. doi:10.1155/2011/754857.
- 508 Pimentel, S. P., Barrella, G. E., Casarin, R. C. V., Cirano, F. R., Casati, M. Z., Foglio, M. A.,
509 et al. (2012). Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model:
510 immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complement. Altern.*
511 *Med.* 12, 224. doi:10.1186/1472-6882-12-224.
- 512 Ramesh, A., Varghese, S. S., Doraiswamy, J. N., and Malaiappan, S. (2016). Herbs as an
513 antioxidant arsenal for periodontal diseases. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 5, 92–6.
514 doi:10.5455/jice.20160122065556.
- 515 Rodrigues, F. E. A., Lima, J. Q., Santiago, G. M. P., Mafezoli, J., Braz-filho, R., and Arriaga,
516 A. M. C. (2010). Diterpene and other Constituents from *Stemodia maritima*
517 (*Scrophulariaceae*). *J Braz Chem Soc* 21, 1581–1586.
- 518 Russell, F. A., Mulabagal, V., Thompson, D. R., Singh-Wilmot, M. A., Reynolds, W. F., Nair,
519 M. G., et al. (2011). Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase
520 enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. *Phytochemistry* 72,
521 2361–2368. doi:10.1016/j.phytochem.2011.08.024.
- 522 Saglam, M., Köseoglu, S., Hatipoglu, M., Esen, H. H., and Köksal, E. (2015). Effect of sumac
523 extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in
524 experimental periodontitis in rats. *J. Appl. Oral Sci.* 23, 33–41. doi:10.1590/1678-
525 775720140288.
- 526 Sezer, U., Kara, M. İ., Erciyas, K., Özdemir, H., Üstün, K., Özer, H., et al. (2013). Protective
527 effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontol.*
528 *Scand.* 71, 38–44. doi:10.3109/00016357.2011.650195.
- 529 Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., et al. (2015).

- 530 Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl. oral Sci.* 23, 329–55.
531 doi:10.1590/1678-775720140259.
- 532 Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., and Layrolle, P. (2010). Experimental animal models
533 in periodontology: a review. *Open Dent. J.* 4, 37–47. doi:10.2174/1874210601004010037.
- 534 Tamaki, N., Cristina Orihuela-Campos, R., Inagaki, Y., Fukui, M., Nagata, T., and Ito, H. O.
535 (2014). Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis
536 via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat
537 periodontitis model. *Free Radic. Biol. Med.* 75, 222–229.
538 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.034.
- 539 Tóthová, L., Kamodyová, N., Červenka, T., and Celec, P. (2015). Salivary markers of oxidative
540 stress in oral diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5. doi:10.3389/fcimb.2015.00073.
- 541 Tringali, G., Mirtella, A., Mancuso, C., Guerriero, G., Preziosi, P., and Navarra, P. (1997). The
542 release of immunoreactive interleukin-1 beta from rat hypothalamic explants is modulated
543 by neurotransmitters and corticotropin-releasing hormone. *Pharmacol. Res.* 36, 269–73.
544 doi:10.1006/phrs.1997.0235.
- 545 Varela-López, A., Bullón, P., Giampieri, F., and Quiles, J. (2015). Non-Nutrient, Naturally
546 Occurring Phenolic Compounds with Antioxidant Activity for the Prevention and
547 Treatment of Periodontal Diseases. *Antioxidants* 4, 447–481. doi:10.3390/antiox4030447.
- 548 Wang, T.-F., Jen, I.-A., Chou, C., and Lei, Y.-P. (2014). Effects of Periodontal Therapy on
549 Metabolic Control in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontal Disease.
550 *Medicine (Baltimore)*. 93, e292. doi:10.1097/MD.0000000000000292.
- 551 Whitby, L. G., and Moss, D. W. (1975). Analysis of heat inactivation curves of alkaline
552 phosphatase isoenzymes in serum. *Clin. Chim. Acta* 59, 361–367. doi:10.1016/0009-
553 8981(75)90012-1.

554 **Conflict of Interest Statement:** *The authors declare that the research was conducted in the*
555 *absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential*
556 *conflict of interest.*

557 **Author contributions**

558 AT and JF treated the animals, performed all assays, analysis and interpretation of data. LS
559 induced periodontitis. AA and FS performed the collection and extraction of plant material. NS
560 performed cytokines analysis. IM, KP and IS performed histopathological analysis. AP assisted
561 in laboratory experiments. JC performed quantitative PCR analysis. GC-F and VP performed
562 and analysed the *S. maritima* Linn toxicity profile. MB, HC and PG designed and supervised
563 the study. AT and MB wrote the paper. All authors critically reviewed and approved the
564 manuscript.

565 **Acknowledgments**

566 This work was supported by Brazilian grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)
567 (grant #471974/2013-7), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
568 (Capes) / Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap)
569 (grant # AE1-0052-000180100/2011). The authors are grateful to Bruno C. Vasconcelos from
570 the School of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil for the microCT
571 images.

572 **Table 1. Description of biomarkers, gene, primer sequences and NCBI accession numbers.**
573

Biomarkers	Gene	Primer sequence (5'-3')	NCBI
Inflammatory modulators	TNF- α	S-CGGGGTGATCGGTCCCAACAAG A-GTGGTTTGCTACGACGTGGGC	NM_012675.3
	IL-1 β	S-TGCTGTCTGACCCATGTGAG A-CCAAGGCCACAGGGATTTTG	NM_031512.2
	iNOS	S-AGGCACAAGACTCTGACACC A-GGTAGGGTAGAGGAGGGGAG	NM_012611.3
Bone makers	RANK	S-AGGGAAAACGCTGACAGCTAA A-CCAACACAATGGTCCCCTGA	NM_001271235.1
Reference gene	GAPDH	S-GGACCAGGTTGTCTCCTGTG A-CATTGAGAGCAATGCCAGCC	NM_017008.4

574
575
576
577

Table 2. Effect of oral gavage of Sm extracts and vehicle (saline+DMSO) on histopathologic score of rat maxillae.

	<i>Stemodia maritima</i> (Sm) mg/kg				
	Naive	Vehicle	0.2	1	5
Escores (median values and range)	0 (0-0)	3 (2-3)*	2 (1-2)	2 (2-2)	1 (1-2)**

578 * $P < 0.05$ versus naïve group (CONTROL); ** $P < 0.05$ versus vehicle group (animals submitted
579 to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (Kruskal-Wallis followed by
580 Dunn's test).

581
582

Table 3. Systemic effects of Sm 5mg/kg and vehicle in experimental periodontitis in rats.

Parameters	Groups		
	Naïve	Vehicle	Sm 5 mg/kg
Body mass (g) before	185,4 \pm 10,68	197,3 \pm 7,12	199,8 \pm 3,52
Body mass (g) after	189,6 \pm 15,52	209,4 \pm 7,24	201,7 \pm 4,67
Liver (g)/body mass	9,90 \pm 0,35	7,53 \pm 0,31	7,18 \pm 0,32
Kidney (g)/body mass	1,82 \pm 0,04	0,95 \pm 0,03	0,82 \pm 0,04
Heart (g)/body mass	0,88 \pm 0,03	0,66 \pm 0,03	0,71 \pm 0,03
Creatinine (mg/dl)	11,40 \pm 0,26	12,30 \pm 0,41	11,08 \pm 0,33
AST (UI/L)	117,3 \pm 10,81	129,4 \pm 11,09	113,9 \pm 21,14
ALT (UI/L)	38,67 \pm 2,53	33,46 \pm 0,85	40,13 \pm 1,73
TALP (UI/L)	94,87 \pm 10,63	115,2 \pm 17,00	94,42 \pm 12,79

583 Data are expressed as mean \pm SEM (n=6) (ANOVA and Tukey's or Games-Howell *post hoc*
584 test).

585
586
587
588

FIGURE 1. Effect of oral gavage of vehicle (saline+DMSO) and Sm extracts concentrations on alveolar bone loss (0.2, 1 and 5 mg/kg) in experimental periodontitis. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. * $P < 0.05$ was considered significantly different compared

589 to the naïve control group; $**P < 0.05$ was considered significantly different compared to vehicle
590 group (saline+DMSO). (ANOVA and Games-Howell *post hoc* test).

591

592 **FIGURE 2.** Macroscopic view (first column), microCT images (second column) and
593 histological aspects (third column) of Naive, Vehicle and Sm 5mg/kg. Data represent the mean
594 \pm SEM of six animals/group. (A), (B) and (C) indicates normal maxilla (naive), showing
595 integrity of its components (c. Cementum, d. Dentine and ab. Alveolar bone). (D), (E) and (F)
596 shows maxilla subjected to experimental periodontitis that received only the vehicle
597 (saline+DMSO), showing severe bone resorption, inflammatory infiltrate in gingiva and
598 periodontal ligament, extensive cementum destruction and total resorption of the alveolar
599 process. (G), (H) and (I) indicate maxilla after 11 days of experimental periodontitis treated
600 with Sm 5mg/kg showing discrete cell influx and preservation of the alveolar process and
601 cementum. Magnification x100.

602

603 **FIGURE 3.** Effects of Sm 5mg/kg and saline+DMSO (vehicle) on the plasma bone alkaline
604 phosphatase (BALP) in experimental periodontitis in rats. Data represent the mean \pm SEM of
605 six animals/group. $*P < 0.05$ compared with naïve group (control) $**P < 0.05$ compared with
606 vehicle group (animals submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO)
607 (ANOVA and Games-Howell *post hoc* test).

608

609 **FIGURE 4.** Effects of Sm 5mg/kg and saline+DMSO (vehicle) on TNF- α , IL-1 β , CINC-1 and
610 IL-10 in gingival tissues levels. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. $*P < 0.05$
611 compared with naïve group (control) $**P < 0.05$ compared with vehicle group (animals
612 submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's
613 *post hoc* test).

614

615 **FIGURE 5.** Effects of Sm 5mg/kg on superoxide dismutase and catalase concentrations in
616 gingival tissues. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. $*P < 0.05$ compared with
617 naïve group (control) $**P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to
618 experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's *post hoc*
619 test).

620

621 **FIGURE 6.** Effects of Sm 5mg/kg on tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-
622 1 β), RANK and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA levels in experimental
623 periodontitis in rats. Data represent the mean \pm SEM. $*P < 0.05$ compared with naïve group
624 (control); $**P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to experimental
625 periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

626

627 **FIGURE 7.** Histological evaluation of organs from animals treated with Sm 5mg/kg and
628 vehicle after 11 days of experimental periodontitis. The organs stained with hematoxylin and
629 eosin. No significant histological alterations were observed in liver (A) and (E), kidney (B) and
630 (F), heart (C) and (G) and stomach (D) and (H). The tissue sections were observed under light
631 microscope at 200x. Scale bar represent 100 μ m.

*A Revista **Frontiers in Physiology** solicita que as figuras não sejam inseridas no corpo do texto e sim anexadas separadamente.

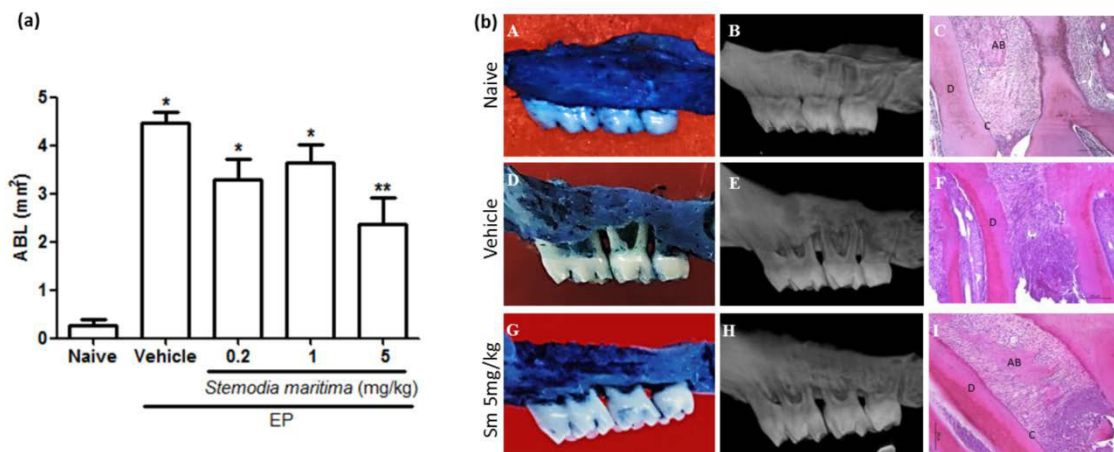


FIGURE 1. (a) Effect of oral gavage of vehicle (saline+DMSO) and Sm extracts concentrations on alveolar bone loss (0.2, 1 and 5 mg/kg) in experimental periodontitis. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. * $P < 0.05$ was considered significantly different compared to the naïve control group; ** $P < 0.05$ was considered significantly different compared to vehicle group (saline+DMSO). (ANOVA and Games-Howell *post hoc* test). **(b)** Macroscopic view (first column), microCT images (second column) and histological aspects (third column) of Naive, Vehicle and Sm 5mg/kg. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. **(A)**, **(B)** and **(C)** indicates normal maxilla (naive), showing integrity of its components (c. Cementum, d. Dentine and ab. Alveolar bone). **(D)**, **(E)** and **(F)** shows maxilla subjected to experimental periodontitis that received only the vehicle (saline+DMSO), showing severe bone resorption, inflammatory infiltrate in gingiva and periodontal ligament, extensive cementum destruction and total resorption of the alveolar process. **(G)**, **(H)** and **(I)** indicate maxilla after 11 days of experimental periodontitis treated with Sm 5mg/kg showing discrete cell influx and preservation of the alveolar process and cementum. Magnification x100.

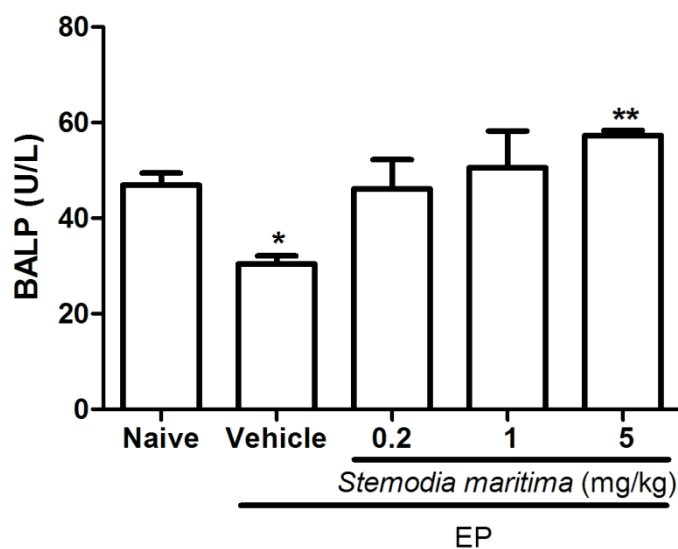


FIGURE 2. Effects of Sm 5mg/kg and saline+DMSO (vehicle) on the plasma bone alkaline phosphatase (BALP) in experimental periodontitis in rats. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. * $P < 0.05$ compared with naïve group (control) ** $P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Games-Howell *post hoc* test).

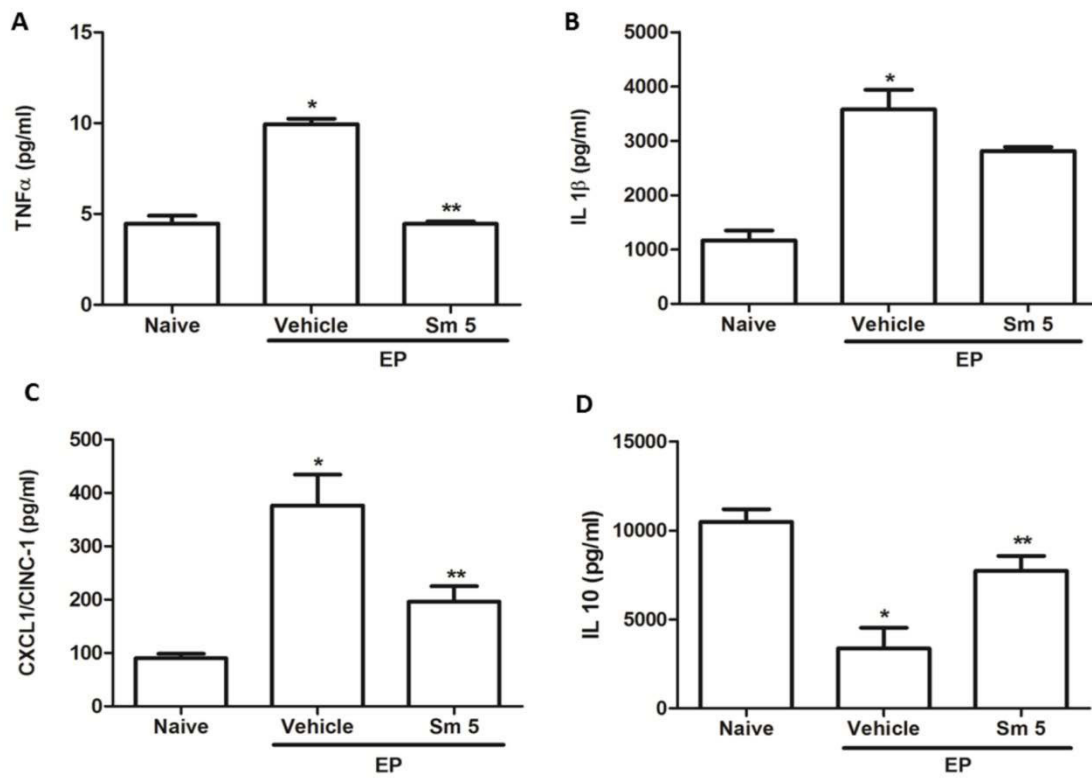


FIGURE 3. Effects of Sm 5mg/kg and saline+DMSO (vehicle) on TNF- α , IL-1 β , CINC-1 and IL-10 in gingival tissues levels. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. * $P < 0.05$ compared with naïve group (control) ** $P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

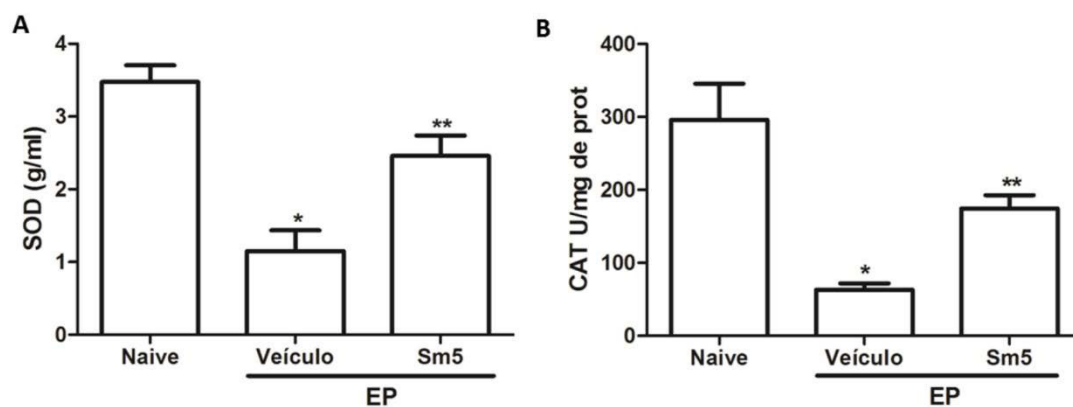


FIGURE 4. Effects of Sm 5mg/kg on superoxide dismutase and catalase concentrations in gingival tissues. Data represent the mean \pm SEM of six animals/group. * $P < 0.05$ compared with naïve group (control) ** $P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

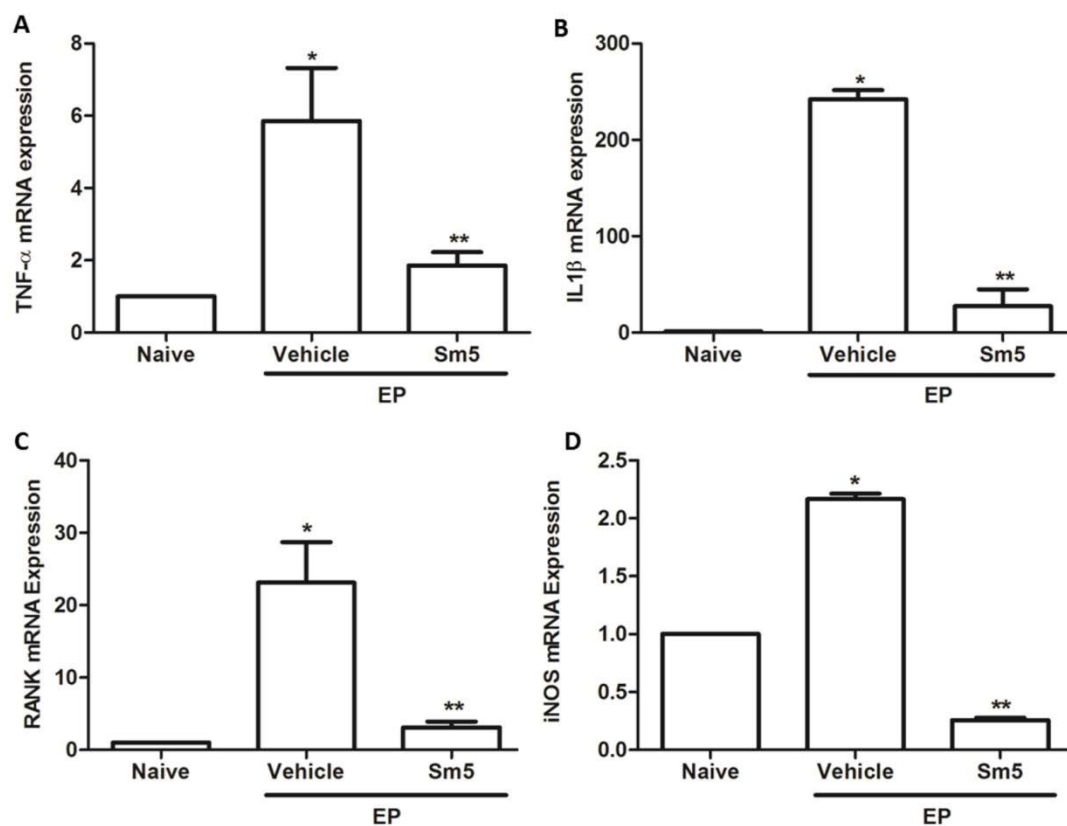


FIGURE 5. Effects of Sm 5mg/kg on tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), RANK and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA levels in experimental periodontitis in rats. Data represent the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with naïve group (control); ** $P < 0.05$ compared with vehicle group (animals submitted to experimental periodontitis and treated with saline+DMSO) (ANOVA and Tukey's *post hoc* test).

4 CONCLUSÃO

O extrato de *Stemodia maritima* Linn. na concentração de 5 mg/kg reduz a perda óssea alveolar no modelo de periodontite induzida por ligadura em ratas ao promover a redução das dosagens de citocinas pro inflamatórias TNF- α , IL-8/CINC-1, aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 no tecido gengival e aumento de FAO sérica.

S. maritima 5 mg/kg reduz a quantidade de radicais livres de oxigênio ao elevar os níveis das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase; assim como a expressão de RNAm de TNF- α , IL-1 β , óxido iNOS e RANK.

A administração de Sm 5 mg/kg durante 11 dias não afeta parâmetros bioquímicos, curva ponderal, peso úmido e análise microscópica dos órgãos, sugerindo que Sm 5 mg/kg pode representar uma ferramenta biotecnológica como opção terapêutica segura em estudos pré-clínicos de periodontite em ratas.

REFERÊNCIAS

- ABUSLEME, L. et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **The ISME Journal**, v. 7, n. 5, p. 1016–1025, 2013.
- ALBACH, D. C.; MEUDT, H. M.; OXELMAN, B. Piecing together the “new” Plantaginaceae. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 297–315, 2005.
- AMADEI, S. U. et al. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 6, p. 538–543, 2011.
- APTE, R. N.; VORONOV, E. Is interleukin-1 a good or bad “guy” in tumor immunobiology and immunotherapy? **Immunological Reviews**, v. 222, n. 1, p. 222–241, 2008.
- ARAÚJO, A. A. et al. Olmesartan decreases IL-1 β and TNF- α levels; Downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; And upregulates OPG in experimental periodontitis. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 10, p. 875–884, 2013a.
- ARAÚJO, A. A. et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1104–1111, 2013b.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for current nursing research. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, 1999.
- ARMITAGE, G. C. Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: A 50-year perspective. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 20–36, 2013.
- ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 1, p. 403–409, 1998.
- BALLI, U. et al. Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 46, n. 2, p. 84–95, 2016.
- BALTACIOGLU, E. et al. Lipid Peroxidation Levels and Total Oxidant/Antioxidant Status in Serum and Saliva From Patients With Chronic and Aggressive Periodontitis. Oxidative Stress Index: A New Biomarker for Periodontal Disease? **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 10, p. 1432–1441, 2014.
- BENDRE, M. S. et al. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 28–37, 2003.
- BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone

loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 6, p. 1009–14, jun. 2000.

BOIVIN, G. et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 532–538, 2008.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 2, n. 6, p. 538–543, 2002.

BONATI, A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 195–197, 1991.

BORGNAKKE, W. S. Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease? **Dental Clinics of North America**, v. 59, n. 4, p. 885–917, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica**, p. 60, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.**, p. 136, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. **Projeto SBBrasil 2010**, p. 92, 2011.

BRASIL. **Resolução-rdc nº 48, de 16 de março de 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**, 2004.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57–80, 2014.

CHAMBRONE, L.; LIMA, L. A. P. A.; CHAMBRONE, L. A. Prevalência das Doenças Periodontais no Brasil. Parte II. 1993-2003. **Revista Odonto**, v. 16, n. 31, p. 69–76, 2003.

CHEN, B. et al. RANKL expression in periodontal disease: Where does RANKL Come from? **BioMed Research International**, 2014.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the**

American Society of Nephrology : **CJASN**, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

DA SILVA, F. et al. Phytochemical study, antioxidant and antibacterial activities of *Stemodia maritima*. **Quim Nova**, v. 37, n. 9, p. 1474–1478, 2014.

DAHIYA, P. et al. Reactive oxygen species in periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 17, n. 4, p. 411–416, 2013.

DATTA, H. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontology 2000**, v. 61, n. 1, p. 16–53, 2013.

DYE, B. A. Global periodontal disease epidemiology. **Periodontology 2000**, v. 58, n. 1, p. 10–25, 2012.

EBERSOLE, J.L.; GRAVES, C.L.; GONZALEZ, O.A.; DAWSON III, D.; MORFORD, L.A.; HUJA, P.E.; HARTSFIELD JR, J.K.; PANDRUVADA, S.; WALLET, S. M. Aging , inflammation , immunity and periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 72, p. 54–75, 2016.

EKUNI, D. et al. Mechanical stimulation of gingiva reduces plasma 8-OHdG level in rat periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 4, p. 324–329, 2008.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.

FORD, P. J.; GAMONAL, J.; SEYMOUR, G. J. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 53, n. 1, p. 111–123, 2010.

FRITOLI, A. et al. The effect of systemic antibiotics administered during the active phase of non-surgical periodontal therapy or after the healing phase: a systematic review. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 249–254, 2015.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178–182, 2005.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GARCIA, R.; DIETRICH, T. Introduction to periodontal epidemiology. **Periodontology 2000**, v. 58, n. 1, p. 7–9, 2012.

GARCIA DE AQUINO, S. et al. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sciences**, v. 84, n. 21–22, p. 745–754, maio 2009.

GARLET, G. P. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349–1363, 2010.

GENCO, R. J.; BORGNAKKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 59–94, jun. 2013.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 3, p. 193–198, 2010.

GOKHALE, S. R.; PADHYE, A. M. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. **Bdj**, v. 214, n. 9, p. 467–471, 2013.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585–1591, 2008.

GRAVES, D. T. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. **J. Infect. Dis.**, v. 28, p. 482–490, 1999.

GRAVES, D. T. et al. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In: **Frontiers of Oral Biology**. [s.l: s.n.]. v. 15p. 117–132.

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

GRIFFEN, A. L. et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. **The ISME Journal**, v. 6, n. 6, p. 1176–1185, 2012.

GUIMARÃES, M. V. et al. Dry Extract of *Matricaria recutita* L. (Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 6, p. 706–715, jun. 2016.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 2014a.

HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 2014b.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J.; GRAVES, D. T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 229–35, 2015.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4, p. 413–421, 2002.

HASSLER, M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World. In: ROSKOV, Y. et al. (Eds.). Leiden: Naturalis, 2017.

HATIPOGLU, M. et al. The effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber. (Hawthorn) extract administration in preventing alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–11, 2015.

HENNEMAN, S. . et al. Local variations in turnover of periodontal collagen fibers in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 3, p. 383–388, 2012.

HERRERA, B. S. . et al. iNOS-Derived Nitric Oxide Stimulates Osteoclast Activity and Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontal**, v. 82, n. 11, p. 1608–1615, 2011.

HIENZ, S. A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 615486, 2015.

JACOB, S. Global Prevalence of Periodontitis: A literature review. **International Arab Journal of Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 26–30, 2012.

JENSEN; GOPALAKRISHNAN; WESTENDORF, J. J. Regulation of Gene Expression in Osteoblasts. **Biofactors**, v. 36, n. 1, p. 25–32, 2010.

KAYAL, R. A. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 3, p. 1–12, 2013.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clinical Chemistry**, 1993.

LALLAM-LAROYE, C. et al. Periodontitis destructions are restored by synthetic glycosaminoglycan mimetic. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 79A, n. 3, p. 675–683, 1 dez. 2006.

LANGDAHL, B.; FERRARI, S.; DEMPSTER, D. W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 8, n. 6, p. 225–235, 2016.

LEITÃO, R. F. C. et al. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 6, p. 956–963, 2005.

LIMA, M. DOS R. et al. The Effect of *Calendula officinalis* on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 28 jun. 2017.

LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European journal of oral sciences**, v. 108, n. 2, p. 123–

129, 2000.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man. **Journal of periodontology**, v. 46, n. 11, p. 677–680, 1975.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1b secretion. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011.

MACKENZIE, A. et al. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 825–835, 2001.

MARIANO, F. S. et al. Antimicrobial peptides and nitric oxide production by neutrophils from periodontitis subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 11, p. 1017–1024, 2012.

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

MENEZES, A. M. A. et al. S-nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 4, p. 514–21, 2012.

MIGUEL, M. D. et al. Fitoterápicos da relação nacional de medicamentos essenciais no Brasil Phytomedicines in the National List of Essential Medicines of. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

ÖZDEM, M. et al. Antioxidant effects of melatonin in heart tissue after induction of experimental periodontitis in rats. **Journal of Oral Science**, v. 59, n. 1, p. 23–29, 2017.

PASTER, B. J. et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770–3783, 2001.

PETERSEN, P. E. et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 9, p. 661–669, 2005.

PIMENTEL, S. P. et al. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 224, 2012.

POZO, P. et al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from

periodontitis-affected patients. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 3, p. 199–207, 2005.

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014.

RODRIGUES, F.E.A.; ARRIAGA, A.M.C.; LEMOS, T.L.G.; SANTIAGO, G.M.P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M. **Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana de *Stemodia maritima* Linn (Scrophulariaceae)**. 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais...**2010

RUSSELL, F. A. et al. Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2361–2368, 2011.

SAGLAM, M. et al. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 23, n. 1, p. 33–41, 2015.

SANTOS, R. S. et al. The use of systemic antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. **The Journal of the American Dental Association**, v. 147, n. 7, p. 577–585, jul. 2016.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141–153, 2015.

SEZER, U. et al. Protective effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 1, p. 38–44, 2013.

SILANO, M. et al. The new European legislation on traditional herbal medicines: Main features and perspectives. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 107–116, 2004.

SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of applied oral science**, v. 23, n. 3, p. 329–55, 2015.

SOCRANSKY, S.S.;HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, p. 135–187, 2005.

SOUSA, L. H. T. et al. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 55–61, 2017.

STRUILLLOU, X. et al. Experimental animal models in periodontology: a review. **The open dentistry journal**, v. 4, n. April, p. 37–47, 2010.

THOMAS, M. V; PULEO, D. A. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. **Journal of dental research**, v. 90, n. 9, p. 1052–61, 2011.

THOMSON, W. M.; SHEIHAM, A.; SPENCER, A. J. Sociobehavioral aspects of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 60, n. 1, p. 54–63, 2012.

TOMOFUJI, T. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 1999–2006, 2007.

TOMOFUJI, T. et al. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 80, n. 11, p. 1799–1808, 2009a.

TOMOFUJI, T. et al. Periodontitis and increase in circulating oxidative stress. **Japanese Dental Science Review**, v. 45, n. 1, p. 46–51, 2009b.

TRIVEDI, S.; LAL, N. Antioxidant enzymes in periodontitis. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 7, n. 1, p. 54–57, 2017.

TSAI, C. C. et al. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 5, p. 378–384, 2005.

VAN DYKE, T. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Infection and inflammatory mechanisms. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. SUPPL. 14, 2013.

VASCONCELLOS, A. G. et al. Fitofármaco, fitoterápico, plantas medicinais: o reducionismo e a complexidade na produção do conhecimento científico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 103–105, 2002.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VERZELETTI, G. N.; GAIO, E. J.; RÖSING, C. K. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 65, n. 6, p. 348–351, 2 jan. 2007.

VETTORE, M. V.; DE AMORIM MARQUES, R. A.; PERES, M. A. Social inequalities and periodontal disease: Multilevel approach in SBBrazil 2010 survey. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. SUPPL.3, p. 29–39, 2014.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.

WADA, T. et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 17–25, 2006.

WANG, T.-F. et al. Effects of Periodontal Therapy on Metabolic Control in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. **Medicine**, v. 93, n. 28, p. e292, 2014.

WHO. Bulletin of the World Health Organization. Regulatory Situation of Herbal Medicines: A worldwide review. p. 1–49, 1998.

WHO. The World Medicines Situation 2011. Medicines prices, availability and affordability. **The World Medicines Situation**, p. 32, 2011.

WHO. Oral Health Surveys - Basic Method. **World Health Organization**, p. 1.137, 2013.

XU, X. C. et al. Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental Periodontitis. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p. 3494–3502, 2015.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, n. August, p. e7, 2013.

ZHAO, B. TNF and Bone Remodeling. **Current Osteoporosis Reports**, 2017.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



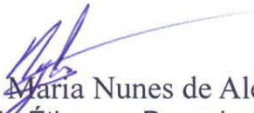
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 08/2013, sobre o projeto intitulado: **“EFICÁCIA E SEGURANÇA DE CIMICIFUGA RECEMOSA E STEMODIA MARITIMA LINN EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE EM RATAS,”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 26 de setembro de 2013.

Fortaleza, 27 de novembro de 2013


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

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