



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DEBORA DA SILVA FREITAS RIBEIRO**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Tocoyena sellowiana***  
**EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE: ANÁLISE DO**  
**ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) E INTERLEUCINA 1 BETA**  
**(IL-1 $\beta$ )**

**SOBRAL-CE**

**2013**

**DEBORA DA SILVA FREITAS RIBEIRO**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Tocoyena sellowiana*  
EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE: ANÁLISE DO  
ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) E INTERLEUCINA 1 BETA  
(IL-1 $\beta$ )**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mirna Marques Bezerra  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro  
Albuquerque

**SOBRAL-CE**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Faculdade de Medicina – *Campus* de Sobral

---

R372e      Ribeiro, Debora da Silva Freitas.  
            Eficácia e segurança do extrato etanólico de *Tocoyena sellowiana* em ensaio pré-clínico de periodontite: análise desenvolvimento de prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ). / Debora da Silva Freitas Ribeiro. – 2013.  
            86 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

            Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.  
            Área de Concentração: Biotecnologia.  
            Orientação: Profa. Dra. Mirna Marques Vieira.  
            Coorientação: Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque.

1. Periodontite. 2. Reabsorção óssea . I. Título.

---

CDD 617.632

**DEBORA DA SILVA FREITAS RIBEIRO**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Tocoyena sellowiana* EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) E INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 $\beta$ )**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

APROVADO EM: 09/12/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mirna Marques Bezerra (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque (Co-orientadora)

Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

Aos meus pais, Lúcia e Norberto, pelo  
imenso amor, incentivo e apoio.  
Ao meu marido, Rodrigo, por tudo.

*“Eu tudo posso naquele que me fortalece”.*

*Filipenses 4:13*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e por sempre me conduzir pelos melhores caminhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, pela confiança depositada em mim, pelo empenho em ensinar as coisas da melhor forma possível, pela acessibilidade em todos os momentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque, pelo fornecimento do extrato sem o qual a realização desse trabalho não seria possível. Pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil em que sempre me atendeu.

À Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves por todo empenho na execução dos experimentos, pela acessibilidade em todos os momentos e por todo o conhecimento repassado durante os anos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Alfredo pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos, sugestões e carinho, os quais muito colaboraram para que eu alcançasse o tão sonhado objetivo.

À Profa. Dra. Lissiana Magna, pelo apoio, dedicação e pela acessibilidade em todos os momentos.

À Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira pela contribuição nas análises histológicas, por todos os ensinamentos, sugestões e carinho em que sempre me recebeu.

À Profa. Dra. Paula Goes pela contribuição com a técnica da fosfatase alcalina óssea.

À Dra. Andreza Maria Lima Pires pelos ensinamentos, pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil em que sempre me atendeu.

À Msc. Jordânia Marques de Oliveira por toda disponibilidade e acessibilidade quando precisei. Muito obrigada amiga.

À doutoranda Daniele Rocha do Val, por todo apoio, dedicação e pela acessibilidade em todos os momentos.

Aos mestrandos e as doutorandas do laboratório de Farmacologia: Kátia Alves, Ângela Vieira, Raul, Isabela, Sheila, José Mário, Christiane Aguiar, Nicolly Frota, Alexandre

Barros, Emmanuelle Noronha, Alrieta, pelos inúmeros momentos compartilhados, pois, conviver com vocês foi de grande aprendizado para a vida.

Ao técnico de laboratório Junior Lima por toda dedicação nos cortes histológicos e principalmente pela amizade que foi construída ao longo dos dias árduos de trabalho dentro do laboratório de Patologia.

Aos técnicos em especial ao Rulio Rocha, Francisco José Gomes, por compartilharmos momentos importantes dentro do laboratório e por toda ajuda.

À todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia de Sobral. Em especial aos meus queridos IC's, Samuel Mateus, Natacha Arriaga, Júlio César, Bárbara e Aline, pela ajuda incondicional, pela dedicação e por contribuírem muito para a minha formação profissional. Obrigada, por tornarem tão agradável a realização deste trabalho. Acredito que não existam palavras para expressar a minha gratidão a vocês.

Aos gêmeos mais queridos Jonas e Jonatas por todo carinho e ajuda.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, por todo conhecimento repassado.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, Gady, Diná, Almino, Alcione, Araújo, Antônio, Robério, Aline, Carlos, Keila, Ana, Edílda, por todo empenho e dedicação em suas atividades.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*“Teu coração está onde estão teus tesouros”  
Mateus 6*

A minha Mãe, Maria Lúcia Conceição da Silva Freitas, pelo amor incondicional e por todo incentivo, confiança e dedicação compartilhados os quais foram certamente essenciais para a concretização de meus objetivos. Amo você.

Ao meu Pai, Norberto Souza Freitas (*in memorian*), meu modelo de homem: caráter, doçura, dedicação e persistência. Insostituível. Penso em você todos os dias, em cada detalhe pequeno do cotidiano, o quanto está presente em minha vida, mesmo em outro plano, dentro do meu coração, nas minhas atitudes e decisões. Te amo muito.

Ao meu Esposo, Rodrigo Martins Ribeiro, por toda dedicação, por sempre dizer que tudo vai dar certo e que sempre vai estar do meu lado me apoiando. Muito obrigada por tanto amor, sou mais feliz por você fazer parte da minha vida. Amo você.

Ao meu Irmão, Murilo da Silva Freitas, parceiro fiel e indissolúvel.

Aos meus tios Fátima e Norival, por todo amor, carinho e apoio desde a infância até os dias de hoje.

Aos meus Avôs paternos Amélia e Sebastião (*in memorian*) e maternos Irene e João (*in memorian*), por me proporcionarem tanto amor.

A Nadir e Altair por sempre estarem presentes me apoiando.

A todos meus familiares por suas presenças constantes e apoio inigualáveis.

## RESUMO

A periodontite é um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos de sustentação dos dentes caracterizados por extensa reabsorção óssea alveolar. A *Tocoyena sellowiana* (*Ts*) é uma árvore de pequeno porte, pertencente à família Rubiaceae, conhecida popularmente como genipapo bravo, típica do Cerrado, cuja casca do caule é utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança do extrato etanólico da casca do caule de *Tocoyena sellowiana* em um ensaio pré-clínico de periodontite. A periodontite (PE) foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) nos molares superiores de ratas *Wistar* (200-220 g). Os animais foram pesados e tratados (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com *Ts* (0,1; 1 ou 10 mg/kg). O grupo não tratado foi submetido à indução de periodontite e tratado (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com o veículo (salina). Foram analisados os seguintes parâmetros: perda óssea alveolar, dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO), PGE2, IL-1 $\beta$ , mieloperoxidase (MPO), análise imunohistoquímica para COX-2, e avaliação da segurança da *Ts*. A *Ts* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) reduziu ( $p < 0,05$ ) a perda óssea alveolar ( $4,96 \pm 0,39$ ,  $3,89 \pm 0,13$  e  $1,74 \pm 0,15$ , respectivamente), em relação ao grupo controle ( $7,09 \pm 0,43$ ); os animais tratados com *Ts* (10 mg/kg), tiveram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da variação da FAO ( $6,99 \pm 65,3$ ) em relação ao grupo não tratado ( $6,91 \pm 33,6$ ). *Ts* (10 mg/kg) diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis de PGE2 em amostras gengivais ( $212,3 \pm 2,26$ ), em comparação com o grupo não tratado ( $355,7 \pm 4,33$ ). *Ts* (10 mg/kg) diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis de IL-1 $\beta$  em amostras gengivais ( $237,4 \pm 0,86$ ), em comparação com o grupo não tratado ( $868,1 \pm 1,99$ ). *Ts* (10 mg/kg) diminuiu a marcação de COX-2 quando comparados ao grupo não tratado. *Ts* (10 mg/kg) diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis de MPO na 6<sup>a</sup> hora em amostras gengivais ( $0,77 \pm 7,38$ ), em comparação com o grupo não tratado ( $1,54 \pm 21,1$ ). Não se observou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os níveis séricos de ALT/ AST, creatinina e fosfatase alcalina total entre grupos tratados com *Ts* e não tratado. Os animais tratados com *Ts* (10 mg/kg) não tiveram alterações no parênquima hepático, renal, no tecido cardíaco e na mucosa gástrica quando comparados aos animais do grupo não tratado. Nossos resultados sugerem que *Ts* possui efeito protetor na periodontite através da inibição PGE2, IL-1 $\beta$ , MPO e aumento de FAO, além de representar uma opção terapêutica segura no ensaio pré-clínico de periodontite em ratas.

**Palavras-chave:** *Tocoyena sellowiana*, Periodontite, Reabsorção Óssea.

## ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory process that affects the supporting tissues of the teeth characterized by extensive alveolar bone resorption. The *Tocoyena sellowiana* (*Ts*) is a small tree belonging to Rubiaceae family, popularly known as typical angry genipapo, Cerrado, whose stem bark is used in folk medicine as anti - inflammatory agent. This study aimed to evaluate the efficacy and safety of the ethanol extract of the stem bark of *Tocoyena sellowiana* in a pre-clinical trial of periodontitis. Periodontitis (PE) was induced by placing a nylon thread (3.0) on the upper molars of Wistar rats (200-220 g). Animals were weighed and treated (*per os*) daily for 11 days, with *Ts* (0.1, 1 or 10 mg/kg). The untreated group underwent induction of periodontitis and treated (*per os*) daily for 11 days with vehicle (saline). Alveolar bone loss, serum bone alkaline phosphatase (FAO), PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , myeloperoxidase (MPO), immunohistochemical analysis for COX-2, and safety assessment of *Ts*: the following parameters were analyzed. The *Ts* (0.1, 1 or 10 mg / kg ) reduced ( $p < 0.05$ ) bone loss ( $4.96 \pm 0.39$ ,  $3.89 \pm 0.13$  and  $1.74 \pm 0.15$  respectively) , compared to the control group ( $7.09 \pm 0.43$ ), animals treated with *Ts* (10 mg/kg) had a significant increase ( $p < 0.05$ ) of the variation of the FAO ( $6.99 \pm 65.3$ ) compared to the untreated group and ( $33.6 \pm 6.91$ ) . *Ts* (10 mg/kg) decreased ( $p < 0.05$ ) levels in gingival samples of PGE<sub>2</sub> ( $212.3 \pm 2.26$ ), compared with the untreated group ( $355.7 \pm 4.33$ ). *Ts* (10 mg/kg) decreased ( $p < 0.05$ ) levels of IL-1 $\beta$  in gingival samples ( $237.4 \pm 0.86$ ), compared with the untreated group ( $868.1 \pm 1.99$ ). *Ts* (10 mg/kg) decreased marking COX-2 when compared with the untreated group. *Ts* (10 mg/kg) decreased ( $p < 0.05$ ) levels of MPO in the gingival 6 hour samples ( $0.77 \pm 7.38$ ) compared with the untreated group ( $1.54 \pm 21.1$ ). No difference ( $p > 0.05$ ) between the serum levels of ALT/AST, creatinine and total alkaline phosphatase between treated groups and untreated *Ts* was observed. The animals treated with ST (10 mg/kg) had no change in hepatic, renal tissue, cardiac tissue and gastric mucosa as compared with animals in the untreated group. Our results suggest that *Tocoyena sellowiana* has protective effect on periodontitis by inhibiting PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , and MPO increased FAO, and represents a safe therapeutic option in the pre-clinical trial of periodontitis in rats.

**KEY WORDS:** *Tocoyena sellowiana*, Periodontitis, Bone Resorption.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do dente com seu periodonto	20
<b>Figura 2:</b> Ilustração de <i>Tocoyena sellowiana</i>	35
<b>Figura 3:</b> Esquema ilustrativo da análise da perda óssea alveolar após indução da periodontite	40
<b>Figura 4:</b> Efeito de <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a perda óssea alveolar em ratas submetidas à indução de periodontite	50
<b>Figura 5:</b> Fotografia ilustrativa da maxila de ratas (face vestibular) submetidas à indução da periodontite e tratados com <i>Tocoyena sellowiana</i>	51
<b>Figura 6:</b> Microfotografia da maxila de ratas 11 dias após indução da periodontite e tratados com <i>Tocoyena sellowiana</i>	53
<b>Figura 7:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO) em ratas submetidas à periodontite	55
<b>Figura 8:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a produção de PGE2 e de IL-1 $\beta$ em tecido gengival de ratas submetidas à periodontite	57
<b>Figura 9:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a análise imunohistoquímica para a COX-2 na maxila de ratas submetidas à periodontite	58
<b>Figura 10:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a atividade da enzima MPO em gengiva de ratas submetidas à periodontite	59
<b>Figura 11:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a curva ponderal de ratas submetidas à indução da periodontite	61
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografias de órgãos de ratas tratadas com <i>Tocoyena sellowiana</i> e submetidos à indução da periodontite	63
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografias da mucosa gástrica de animais tratados com <i>Tocoyena sellowiana</i> e submetidos à indução da periodontite	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Escores e critérios histopatológicos para análise da Periodontite.	41
<b>Tabela 2:</b> Efeito do tratamento com <i>Tocoyena sellowiana</i> na análise histopatológica da maxila de ratas submetidas à periodontite.	54
<b>Tabela 3:</b> Avaliação de parâmetros bioquímicos de ratas submetidas à indução de periodontite experimental e tratadas com <i>Tocoyena sellowiana</i>	62
<b>Tabela 4:</b> Avaliação do peso úmido de órgãos de ratas submetidas à indução da periodontite experimental e tratadas com <i>Tocoyena sellowiana</i>	62
<b>Tabela 5:</b> Análise histopatológica do efeito de <i>Tocoyena sellowiana</i> sobre a mucosa gástrica de ratas submetidas à periodontite.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT**- Transaminase Glutâmico Pirúvica  
**AST**- Transaminase Glutâmico Oxalacética  
**AkT**- Proteína quinase específica de serina  
**CO**- Monóxido de carbono  
**COX-1**- Ciclo- oxigenase tipo 1  
**COX-2**- Ciclo- oxigenase tipo 2  
**COX-3**- Ciclo- oxigenase tipo 3  
**EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra- acético  
**FA**- Fosfatase alcalina  
**FAT**- Fosfatase alcalina total  
**FAO**- Fosfatase alcalina óssea  
**g**- Grama  
**Kg**- Quilograma  
**kDA**- Quilodalton  
**H+** - Íons de hidrogênio  
**IL-1**- Interleucina 1  
**IL-1 $\beta$** - Interleucina 1 beta  
**IL- 6**- Interleucina 6  
**IL- 17**- Interleucina 17  
**LPS**- Lipopolissacarídios  
**Mm<sup>2</sup>**- Milímetro quadrado  
**MMP**- Metaloproteinases de matriz  
**MPO**- Mieloperoxidase  
**Nrf-2**- Fator nuclear eritróide 2  
**OPG**- Osteoprotegerina  
**PI3K**- Proteína quinase específica de serina  
**PGE2**- Prostaglandina da Série E2  
**RANK**- Receptor ativador do fator nuclear Kappa- beta  
**RANKL**- Proteína ligante de RANK  
**TNF**- Fator de necrose tumoral  
**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2.JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>3.REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
3.1.PERIODONTITE	20
3.2.PERIODONTITE EXPERIMENTAL	23
3.3.MECANISMOS CELULARES DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	25
3.4.CITOCINAS NA PERIODONTITE	28
3.5.CICLOOXIGENASES NA PERIODONTITE	29
3.6.USO DE PRODUTOS NATURAIS PELAS COMUNIDADES: OPÇÃO TERAPÊUTICA NA PERIODONTITE	32
3.7. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	33
<b>4.OBJETIVO GERAL</b>	37
4.1.OBJETIVO ESPECÍFICO	37
<b>5.METODOLOGIA</b>	37
5.1.ANIMAIS	37
5.2.DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS	38
5.3. OBTENÇÃO DA <i>Tocoyena sellowiana</i>	38
5.4.MODELO EXPERIMENTAL	39
5.5.PARÂMETROS AVALIADOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL	40
5.5.1.PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	40
5.5.2.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	41
5.5.3.DOSAGEM SÉRICA DA VARIAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA	42
5.5.4.DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2)	42
5.5.5.DOSAGEM D INTERLEUCINA 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	43
5.5.6.IMUNOHISTOQUÍMICA	43
5.5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	44
5.6.MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA	45
5.7.AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS	45
5.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO, RIM, CORAÇÃO	47
5.9.ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA	48

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>6. RESULTADOS</b>	49
6.1. EFICÁCIA DE <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NO MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS	49
6.2. EFEITO DE <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS OBSERVADAS NO MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS	52
6.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A DOSAGEM DE FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA (FAO) EM RATAS SUBMETIDAS À PERIODONTITE	55
6.4. EFEITO DO TRATAMENTO <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) EM TECIDO GENGIVAL DE RATAS SUBMETIDAS À PERIODONTITE.	56
6.5. EFEITO DO TRATAMENTO COM <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) EM TECIDO GENGIVAL DE RATAS SUBMETIDAS À PERIODONTITE	56
6.6. EFEITO DO TRATAMENTO COM <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO PARA COX-2	56
6.7. EFEITO DO TRATAMENTO COM <i>Tocoyena sellowiana</i> SOBRE A MEDIDA DE ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDADE (MPO) EM GENGIVA DE RATAS	56
6.8. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETOS SISTÊMICOS	60
6.8.1. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA CURVA PONDERAL	60
6.8.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MASSA ÚMIDA DOS ÓRGÃOS	60
6.8.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS (CORAÇÃO, FÍGADO E RIM)	60
6.8.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA MUCOSA GÁSTRICA	64
<b>7. DISCUSSÃO</b>	66
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	73
<b>9. CONCLUSÃO</b>	74
<b>REFERÊNCIAS</b>	75



## 1.INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e progressiva caracterizada por infiltração de leucócitos, perda de tecido conjuntivo, reabsorção de osso alveolar e formação de bolsa periodontal (ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007). Neste processo destrutivo, a colonização de bactérias juntamente com a resposta imune-inflamatória do hospedeiro conduzem à geração de mediadores inflamatórios o que culmina com a perda de osso alveolar (SLOTS, 2013).

Estudos epidemiológicos, embora ainda escassos, demonstram uma alta prevalência da periodontite em todo mundo, podendo ser observada em todas as faixas etárias, embora exista uma correlação positiva entre idade e gravidade doença (ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007). Ainda, outros autores têm demonstrado que a gengivite e a periodontite apresentam maiores prevalências em populações com piores indicadores socioeconômicos, como baixa renda e pouca escolaridade (SB Brasil, 2004; MARTINS *et al.*, 2012). De fato as perdas dentárias constituem-se em uma marca da desigualdade social, diminuem a capacidade mastigatória, dificultando e limitando o consumo de diversos alimentos, afetam a fonação e causam danos estéticos que podem originar alterações psicológicas. Além disso, a periodontite também constitui um fator de risco significativo para as doenças cerebrovasculares, diabetes tipo II, parto prematuro e doenças cardiovasculares (PUCHER; STEWART, 2004; GOLDIE, 2010). Esse conjunto de repercussões no cotidiano dos pacientes contribui significativamente para a redução de sua qualidade de vida (BARBATO *et al.*, 2007).

Segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças periodontais apresentam alta incidência e prevalência na população brasileira, representando, portanto, um grave problema de saúde pública (SB Brasil, 2011). O percentual de brasileiros com problemas periodontais 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 (35 a 44 anos), em que se observa uma prevalência de 19%. Quanto às diferenças regionais, cabe menção ao percentual de adolescentes sem problemas gengivais, que varia de 69% na região Norte a 43% na região Sudeste (SB Brasil, 2011).

A etiopatogenia da periodontite envolve uma interação dinâmica multifacetada de periodontopatógenos, eventos ambientais adversos, fatores de susceptibilidade genética e as respostas imune inata e adaptativa, envolvendo a geração de mediadores

inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , metaloproteinases de matriz (MMP) e prostaglandina E<sub>2</sub> – PGE<sub>2</sub>) que são responsáveis pela amplificação e manutenção da resposta inflamatória, ocasionando em última instância a destruição do osso alveolar, culminando com a perda dentária (ARAÚJO *et al.*, 2013). Tais eventos produzidos pela resposta imune do hospedeiro, embora representem uma resposta de proteção, são co-responsáveis pela destruição tecidual que caracteriza a periodontite (PAGE; KORNMAN, 2004; KINANE *et al.*, 2003, SLOTS, 2013).

O Brasil possui uma flora, com um número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais pela população (RODRIGUES, 2006). Entretanto, ainda se observa uma subutilização deste potencial como fonte de novas moléculas, e seu consumo está normalmente associado com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tendo seu uso e indicação respaldados apenas pela própria comunidade (VEIGA JÚNIOR, 2005). Em virtude destes dados, a fitomedicina vem despertando o interesse da comunidade acadêmica e da indústria farmacêutica tanto ao nível nacional quanto mundial. A ideia é estudar os fitoterápicos, realizar comprovação de sua eficácia e segurança, por meio de estudos pré-clínicos e clínicos, com custos significativamente menores do que o desenvolvimento de drogas por síntese química (CALIXTO, 2005; CARVALHO *et al.*, 2007).

O gênero *Tocoyena* (família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae) possui cerca de 30 espécies, representado por árvores de pequeno porte, típicas do Cerrado. *Tocoyena sellowiana* é conhecida popularmente como genipapo bravo, cuja casca do caule é utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório (PEREIRA *et al.*, 2004).

A despeito do uso frequente pelas comunidades de produtos naturais, o uso dessa terapêutica na periodontite ainda carece de estudos pré-clínicos e clínicos que possam ratificar a eficácia e comprovar seus benefícios através de estudos que abordem a fisiopatologia da periodontite (LA TOUCHE *et al.*, 2010). Neste sentido, este estudo se propõe investigar a eficácia e segurança do extrato etanólico da casca do caule de *Tocoyena sellowiana* em um ensaio pré-clínico de periodontite.

## 2. JUSTIFICATIVA

A periodontite exibe uma grande variedade de manifestações microbiológicas e imunológicas e pode exigir intervenção terapêutica complexa (SANZ; VAN WINKELHOFF, 2011). Permanece como uma importante causa de perda dentária em adultos e um fator de risco para diversas doenças sistêmicas. Além disso, afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, desequilibrando o sistema estomatognático como mastigação, deglutição, podendo ainda comprometer a fala, assim como a estética do sorriso, consequentemente afetando a autoestima (ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007).

Tradicionalmente a periodontite é tratada por procedimentos mecânicos, a fim de descontaminar a superfície coronária e radicular (GOLUB *et al.*, 1998; SALUM *et al.*, 2002), podendo comprometer o cimento, o ligamento periodontal, o osso alveolar, gerando recessão gengival e perda dental. Além disso, como coadjuvantes, são utilizados fármacos por via sistêmica, que possam atuar nos patógenos periodontais e modular a resposta do hospedeiro. Entretanto, via de regra, essas medicações promovem efeitos apenas paliativos sem interferir no curso evolutivo da doença (ARAÚJO *et al.*, 2013).

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, para o tratamento de diversas doenças, tendo como linhas condutoras a preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável de uma terapêutica complementar, além do benefício à população brasileira.

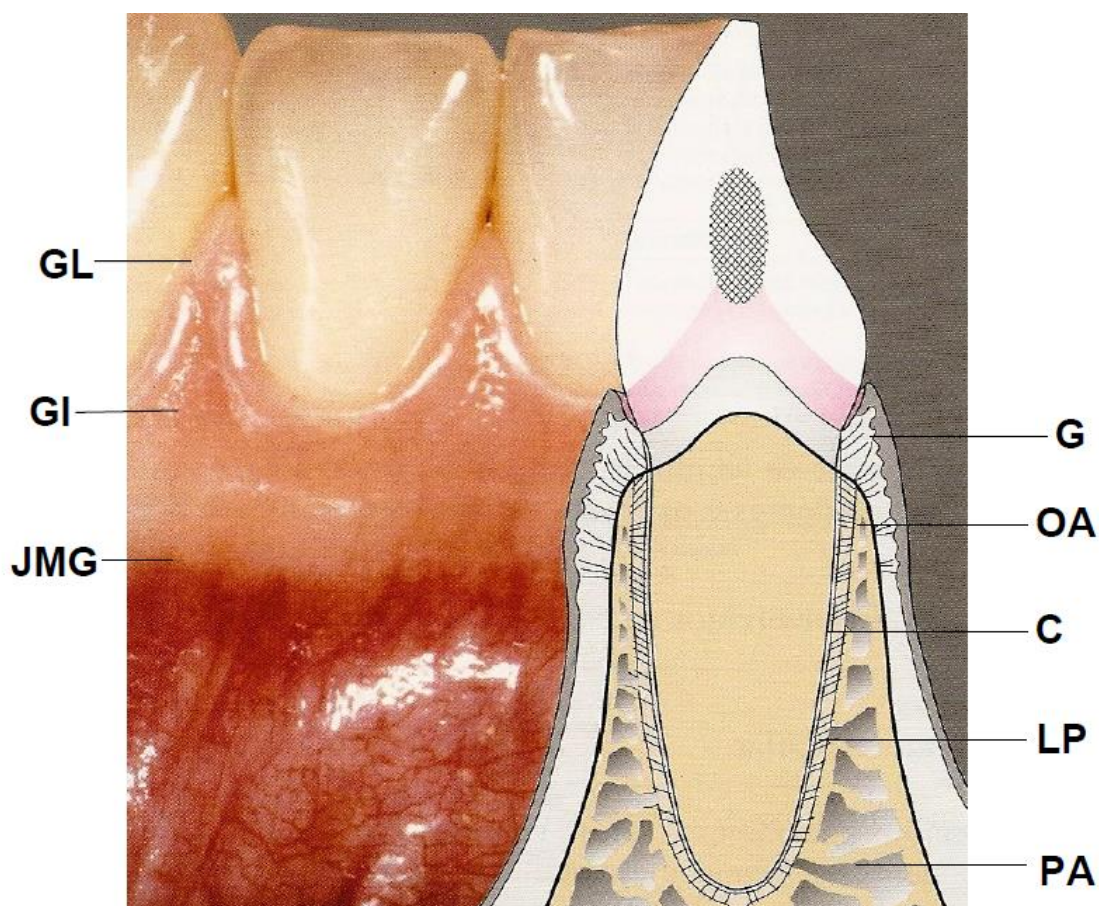
O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, refletindo em uma melhor qualidade de vida da população (CALIXTO *et al.*, 2000).

Neste sentido, o estudo da possível eficácia do extrato etanólico da casca do caule de *Tocoyena sellowiana* na periodontite em ratas poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para o manejo da periodontite.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PERIODONTITE

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente), também chamado de “aparelho de inserção” ou “aparelho de suporte dos dentes”, compreende uma unidade de desenvolvimento, que sofre alterações com a idade e mudanças morfológicas determinadas por condições fisiológicas (como gravidez) e/ou patológicas (gingivite, periodontite) (LINDHE *et al.*, 2010). Possui como função assegurar a inserção do dente no tecido ósseo das maxilas, mantendo a integridade da mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto, portanto, é composto por gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar (**Figura 1**).



**Figura 1: Desenho esquemático do dente com seu periodonto. G:** gengiva, **C:** cimento, **LP:** ligamento periodontal, **OA:** osso alveolar, **PA:** processo alveolar, **GL:** gengiva livre, **GI:** gengiva inserida, **JMG:** junção muco gengival. Fonte: WOLF *et al.*, 2006.

O periodonto de proteção compreende os tecidos da gengiva, sulco gengival, epitélio juncional e inserção conjuntiva. O periodonto de sustentação abrange o ligamento periodontal, o cimento radicular e osso alveolar (WOLF *et al.*, 2006).

As doenças periodontais possuem alta prevalência na população mundial e manifestam-se, principalmente, em duas entidades distintas: gengivite e periodontite. A gengivite é uma condição inflamatória causada pelo biofilme periodontopatogênico, acomete apenas o periodonto de proteção e, clinicamente, caracteriza-se por edema e vermelhidão, alterações no contorno e consistência da gengiva, com tendência ao sangramento à sondagem delicada (ABREU *et al.*, 2010). A gengivite é caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular aumentada e influxo de monócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico para o tecido conjuntivo periodontal (KINANE *et al.*, 2003). Por outro lado, a periodontite compromete tanto o periodonto de proteção, quanto o periodonto de sustentação. A periodontite ocorre quando o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar são destruídos pelo processo imune-inflamatório, desencadeado pelo acúmulo de biofilme e formação do cálculo dental (SLOTS, 2013).

Bactérias periodontopatogênicas podem causar destruição dos tecidos periodontais de suporte de forma direta, através da ação de seus componentes como o LPS (lipopolissacarídeo presente na parede celular das bactérias Gram negativas), enzimas e toxinas secretadas e, de forma indireta, estimulando as células do hospedeiro a secretarem mediadores inflamatórios que guiam e regulam tal atividade destrutiva (LINS *et al.*, 2007). A primeira linha de defesa contra a bactéria periodontopatogênica é formada pelos polimorfonucleares neutrófilos (PMN). No sulco gengival, os PMNs tentam eliminar as bactérias através da fagocitose. Nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, há uma enzima denominada mieloperoxidase (MPO), a qual é considerada antibacteriana devido às espécies reativas geradas a partir do sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos fagócitos ativados que pode afetar adversamente os tecidos (YAMALIK *et al.*, 2000; MALLE *et al.*, 2007).

A presença da MPO pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido em uma condição inflamatória aguda, embora essa enzima possa ser encontrada em outras células como macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 2011). Quando os tecidos periodontais encontram-se inflamados, ocorre um aumento no número de PMNs nestes tecidos e, conseqüentemente, há uma elevação na atividade da MPO (BORGES JR *et al.*, 2007; MARCACCINI *et al.*, 2010).

Os principais mediadores inflamatórios envolvidos na atividade ósteo-reabsortiva são as citocinas do tipo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ), e prostaglandinas (PG) particularmente as da série E como a (PGE2) (GRAVES; LI; COCHRAN, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedir a disseminação dos microorganismos pelos tecidos periodontais (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004). Entretanto, essas reações de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais porque também são passíveis de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo. Além disso, as reações inflamatórias e imunológicas, cuja extensão alcança níveis mais profundos do tecido conjuntivo, além da base do sulco gengival, podem envolver o osso alveolar nesse processo destrutivo. Assim, tais processos defensivos podem, paradoxalmente, serem responsáveis pela maior parte da lesão tecidual observada na periodontite (PAGE; KORNMAN, 2004; SOUZA, 2011).

Embora as reações inflamatórias e imunológicas no periodonto possam parecer semelhantes às observadas em outras partes do corpo, há diferenças significantes. Isto ocorre, em parte, devido à anatomia do periodonto, com uma permeabilidade característica do epitélio juncional resultando em um processo notavelmente dinâmico envolvendo células e fluidos, preservando todo o tempo a integridade epitelial através da interface tecido duro e tecido mole. Além disso, os processos inflamatórios e imunológicos nos tecidos periodontais não representam respostas a uma espécie microbiana simplesmente, mas a um grande número de microrganismos e seus produtos, agindo durante um período de tempo relativamente longo. A microbiota nas bolsas periodontais encontra-se em um estado de fluxo contínuo, podendo conter mais de 400 espécies diferentes de microrganismos. Entre eles os mais comuns são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Tanerella forsythensis* (Tf), cada uma apresentando potenciais diferentes para a indução de doença, os quais vão variar de acordo com o microambiente e o estágio de colonização. Portanto, a destruição periodontal pode ser o resultado da combinação de fatores bacterianos que variam com o tempo. Desta forma, os eventos moleculares que desencadeiam e mantêm as reações inflamatórias e imune na doença periodontal podem sofrer alterações constantemente e isso pode ser devido a múltiplas espécies microbianas, muitas das quais são considerados organismos comensais. Logo, diante do exposto pode-se inferir que a etiopatogenia da doença periodontal é complexa e, provavelmente, multifatorial,

destacando-se a presença do biofilme periodontopatogênico e a resposta inflamatória e imune do hospedeiro, com a participação de mediadores inflamatórios (DEO; BHONGADE 2010; DE MOLON *et al.*, 2012).

Apesar de existirem inúmeros trabalhos, a questão sobre o papel da resposta celular do hospedeiro nas doenças periodontais ainda carece de estudos adicionais. Por representar a principal doença responsável por perda de dentes em adultos, a elucidação dos eventos moleculares e celulares que ocorrem nas doenças periodontais representa um aspecto essencial para que a destruição do periodonto possa ser controlada e, até mesmo, prevenida. Uma maneira eficaz de se estudar as alterações clínicas e histopatológicas observadas na doença periodontal é através do desenvolvimento de modelos animais que reproduzam as principais manifestações observadas em humanos. Entretanto, uma vez que o termo doença periodontal é muito amplo e engloba várias condições que afetam o periodonto, optou-se por adotar o termo periodontite, por entender-se que, embora os modelos animais sejam extremamente úteis, um único modelo não pode representar todas as condições patológicas que afetam os tecidos periodontais (DEO; BHONGADE 2010).

### **3.2 PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Apesar da extensa literatura a respeito da periodontite, falta ainda uma definição exata do papel da imuno-inflamação na periodontite em respostas aos agentes patogênicos, especialmente por que a periodontite é mais facilmente estudada retrospectivamente no homem e, ainda, marcadores clínicos confiáveis, utilizados para detectar a atividade da doença, não são avaliáveis na prática clínica (LIMA *et al.*, 2008). Nesse sentido, o uso de um modelo animal, no qual determinados parâmetros locais e sistêmicos possam ser estudados prospectivamente são bastante interessantes (LIMA *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, foram realizados diversos estudos utilizando um modelo animal em que a periodontite pode ser induzida, reproduzida e facilmente mensurável. As espécies mais utilizadas são primatas, cães, ratos, coelhos, porcos e hamsters (MADDEN *et al.*, 1994; SELVIG, 1994). 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.

De todos esses animais o mais utilizado é o rato (*Rattus norvegicus albinus*) (ROBINSON *et al.*, 1991), pois a anatomia da junção dentoalveolar da região dos seus molares é a mais semelhante com a descrita no homem. A doença nessa espécie animal pode ser induzida de diversas formas, tais como, por meio de manipulação dietética (GARANT *et al.*, 1979; KLAUSEN, 1991; ROBINSON *et al.*, 1991; SALLAY *et al.*, 1982) , através da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (FIEHN *et al.*, 1992; ROBINSON *et al.*, 1991) e, ainda, por meio da colocação de ligaduras na região cervical dos molares superiores (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2002)

Os achados clínicos e microscópicos da periodontite induzida em ratos são 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 (YOSHIE *et al* 1987; ROBINSON *et al.*, 1991).

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 facilmente mensurável por colocação de ligadura na cervical do segundo molar superior esquerdo (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al*, 2004). Este modelo é altamente reprodutível em que 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 bacteriano 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 na literatura vários trabalhos foram realizados com ratas fêmeas em que foi assegurado a reprodução do modelo, sugerindo, portanto, que o nível de estrogênio não afeta a quantidade de osso alveolar (LEITÃO *et al.*, 2005; AMADEI *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012; MELO; LIMA, 2012; OLIVEIRA, 2013).



Portanto, o modelo de periodontite desenvolvido pelo nosso grupo representa uma importante estratégia para o estudo da fisiopatologia da reabsorção óssea *in vivo*, uma vez que é possível quantificar a perda óssea diretamente. Logo, através desse modelo é possível avaliar os efeitos de ferramentas farmacológicas que possam interferir no curso evolutivo da periodontite nesse processo destrutivo, contribuindo para a compreensão dos fenômenos imune-inflamatórios envolvidos no mecanismo de lise óssea e desenvolvimento de opções terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo desta doença óssea inflamatória.

### 3.3 MECANISMOS CELULARES DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

O tecido ósseo tem algumas funções básicas como suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios, e fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea. Este balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Se este balanço inclinar-se a favor dos osteoclastos, ocorrerá reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas (TAKAYANAGI, 2000; ANDIA *et al.*, 2006)

Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, que sintetizam a matriz orgânica, constituída de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas. Estes componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além do fato de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização (KATCHBURIAN *et al.*, 2002). Os osteoblastos também possuem receptores para hormônios, como o da tireoide, da paratireoide (PTH), estrogênios, glicocorticoides, insulina e vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D3). Ainda, secretam fatores de regulação como Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF- $\beta$  que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica (SODEK *et al.*, 2000).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética (KATCHBURIAN *et al.*, 2002; SODEK *et al.*, 2000). Caracterizam-se por apresentar fosfatase ácida resistente ao

tartarato, adenosina ácida trifosfatada vanadato sensitiva, isoenzima anidrase carbônica II, dentre outras enzimas (KATCHBURIAN *et al.*, 2002; SODEK *et al.*, 2000). Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exhibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova.

Em condições fisiológicas, a formação e a reabsorção óssea são fenômenos acoplados e dependentes. Esse equilíbrio osteoblasto/osteoclasto promove a homeostase óssea, assegurando a manutenção da integridade estrutural e do metabolismo do cálcio (COCHRAN, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Entretanto, em algumas condições patológicas, esse equilíbrio pode ser desviado em favor dos osteoclastos, determinando o surgimento da reabsorção óssea, compreendendo múltiplas etapas que incluem: proliferação de precursores de osteoclastos imaturos, diferenciação e maturação desse tipo celular e degradação das matrizes orgânica e inorgânicas do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000).

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

A fosfatase alcalina total (FAT), contida no plasma, é o somatório de várias isoenzimas provenientes do osso, do fígado, do intestino, e durante a gravidez, da placenta. A fosfatase alcalina óssea (FAO) é um marcador da atividade osteoblástica, e o surgimento desta enzima coincide com a formação óssea (GOES *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2012; GOES *et al.*, 2012). Esta enzima está presente no ligamento periodontal e encontra-se alterada na periodontite (GILBERT *et al.*, 2003). Assim, a dosagem de fosfatase alcalina óssea pode ser utilizada como um marcador da atividade da doença ou como parâmetro de resposta ao tratamento instituído (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A osteoclastogênese é regulada por uma cascata de eventos que envolve a participação de moléculas e citocinas pro-inflamatórias bem como do eixo RANK (receptor ativador NF- $\kappa$ B), seu ligante RANKL e OPG (osteoprotegerina), o qual apresenta um papel crucial em lesões patológicas que envolvem inflamação crônica (COCHRAN, 2008; REID; HOLEN, 2009; GOES *et al.*, 2012).

A tríade RANK-RANKL-OPG tem sido descrita como um sistema chave para o controle da diferenciação da função dos osteoclastos. RANKL é uma proteína de 317 aminoácidos que existe em duas formas, a saber: uma forma ligada à membrana, sendo a mais comum, (com 40-45 kDa), e uma forma solúvel (com 31 kDa). Membro da família do TNF, considerada a mais importante citocina nos processos de reabsorção óssea, RANKL é produzida por osteoblastos e também por outros tipos celulares, incluindo linfócitos T, B e fibroblastos (TEITELBAUM, 2000; COCHRAN, 2008). Seu receptor RANK é expresso na superfície de células pré-osteoclásticas. A interação entre RANK-RANKL induz à formação de osteoclastos maduros (osteoclastogênese), estimulando a perda óssea (XING *et al.*, 2005; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; GOES *et al.*, 2012).

A OPG é uma proteína solúvel, produzida pelas células do ligamento periodontal, fibroblastos gengivais e células epiteliais, que tem propriedades antagônicas ao RANKL. A ligação OPG-RANKL inibe a ligação RANK-RANKL, prevenindo a osteoclastogênese, resultando na inibição da reabsorção óssea (BOYLE *et al.*, 2003; REID; HOLEN, 2009; TAT *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Durante a resposta inflamatória, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-11, IL-17, podem induzir a osteoclastogênese e a perda óssea, pelo aumento da expressão de RANKL e diminuição de OPG. Por outro lado, os mediadores anti-inflamatórios, IL-13 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), podem diminuir a expressão de RANKL e aumentar a expressão de OPG, inibindo a osteoclastogênese (XING *et al.*, 2005; COCHRAN, 2008; GRAVES, 2008; REID; HOLEN, 2009; GOES *et al.*, 2011).

A ligação do RANKL ao pré-osteoclasto ocorre no estágio em que estas células de origem hematopoiéticas se diferenciam em Unidade Formadora de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (UFC-GM). Essa ligação na UFC-GM na presença de fator estimulante de colônia de macrófagos (FSCM) induz a diferenciação de pré-osteoclastos em células multinucleadas que se tornam osteoclastos maduros. Quando RANK liga-se ao seu ligante específico, inicia-se a osteoclastogênese, com ativação e formação de osteoclastos e reabsorção óssea. Entretanto quando a concentração de OPG é relativamente maior que a expressão de RANKL, OPG liga-se ao RANKL inibindo sua ligação ao RANK. Desse modo, ocorre uma redução na formação de osteoclastos e apoptose dos osteoclastos pré-existentes (COCHRAN, 2008).

Segundo Koide e colaboradores (1995), quando os patógenos periodontais colonizam a região, induzem reações inflamatórias nos tecidos circundantes, e células

imunológicas, como células B, macrófagos e células T (Th1 e Th17) são recrutadas para o foco inflamatório. Desta forma, a produção de citocinas pró-inflamatórias e PGE2 é amplificada no sítio inflamatório. As células ativadas secretam RANKL em forma solúvel. As citocinas pró-inflamatórias e PGE2 desempenham papéis importantes na destruição do osso alveolar induzindo a expressão de RANKL pelos osteoblastos. Além disso, receptores “toll-like” ligam-se diretamente sobre os osteoblastos e osteoclastos, e os sinais mediados por esses receptores induzem a expressão de RANKL pelos osteoblastos e melhoram a atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas com a habilidade comum de degradar vários componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. As MMPs estão envolvidas em vários processos fisiológicos, como, por exemplo, o desenvolvimento embrionário, a ovulação, erupção dental, a renovação e remodelação da matriz extracelular. Entretanto, elas também estão presentes em situações patológicas, tais como a tumorigênese, a metástase, na artrite reumatoide, osteoporose e periodontite (McCARTHY *et al.*, 2008) As principais células que produzem MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, os queratinócitos, os monócitos, os macrófagos, os fibroblastos e as células mesenquimais. Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo, a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a TGF- $\alpha$ . Na presença desses fatores de crescimento e citocinas, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular. A atividade 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 (NAVARRO *et al.*, 2006; GRAVES, 2008).

### **3.4 CITOCINAS NA PERIODONTITE**

As citocinas são polipeptídios extracelulares, hidrossolúveis, com peso molecular variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos. Esses polipeptídios extracelulares transmitem informações de uma célula à outra através de mecanismos autócrinos ou parácrinos (TABA *et al.*, 2005; LINS *et al.*, 2007; SOMMER, WHITE, 2010). Além disso, as citocinas estimulam suas células-alvo a produzir mais citocinas,

amplificando a resposta imune/inflamatória (ZHANG, 2007). Ao nível molecular, as citocinas exercem seus efeitos através da ligação aos receptores de membrana que possuem atividade intrínseca de quinase, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma as citocinas podem amplificar ou inibir a resposta imune/inflamatória influenciando a diferenciação/proliferação das células imunológicas, regulando a produção e a atividade de outras citocinas (ROSSOMANDO; WHITE, 1993; CURFS, 1997; PRESHAW; TAYLOR, 2011; KARIMBUX *et al.*, 2012).

Muitos estudos destacam as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17, que estimulam a reabsorção óssea diretamente por induzir a proliferação de progenitores de osteoclastos, e indiretamente por estimular a atividade de reabsorção dos osteoclastos maduros (BELIBASAKIS e BOSTANCI, 2012) e por aumentar a síntese de collagenases (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

O TNF- $\alpha$  é uma proteína trimérica secretada por monócitos-macrófagos e desempenha um papel fundamental na periodontite como mediador de destruição tecidual (LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO; WHITE, 1993; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SANDROS *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  exerce importante papel na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Essa citocina induz a produção local de prostaglandinas, induz a secreção de metaloproteinases, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local (LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO. WHITE, 1993; SANDROS *et al.*, 2000). Além disso, a utilização de substâncias inibidoras de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , como a pentoxifilina e, mais seletivamente para TNF- $\alpha$  como a talidomida, foram capazes de reduzir, de forma significativa e dose-dependente, a perda óssea alveolar e o processo inflamatório em modelo de periodontite em ratos (LIMA *et al.*, 2004), confirmando o papel importante dessa citocina na evolução da doença.

### **3.5 CICLOOXIGENASES NA PERIODONTITE**

Um dos passos enzimáticos sequenciais responsáveis pela biossíntese das prostaglandinas é regulado pelas isoenzimas ciclooxigenases (COX). No início dos anos 90 foi demonstrada a existência de duas isoformas da COX, a saber: COX-1 e COX-2, que são enzimas associadas à membrana. A isoforma constitutiva, COX-1, induz a

produção de PGs envolvidas na regulação de funções fisiológicas como citoproteção da mucosa gástrica, homeostase renal e função plaquetária. Uma segunda isoforma, COX-2, codificada por um gene diferente, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos, sendo portanto, responsável pela formação das PGs associadas com a resposta inflamatória. Essas linhas de evidência determinaram a sugestão de que a inibição de COX-2 seria responsável pelos efeitos terapêuticos dos agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), enquanto a inibição de COX-1 seria responsável pela toxicidade desses agentes.

Considerando-se essa premissa, a indústria farmacêutica vem desempenhando grandes esforços para desenvolver inibidores seletivos de COX-2, com pouca ou nenhuma atividade sobre COX-1 (VANE, BAKHLE E BOTTING, 1998). Ademais, recentemente, uma variante da COX-1 (COX-3) foi clonada (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). Essa terceira variante da COX é na realidade um produto do gene da COX-1, sendo expressa abundantemente no córtex cerebral de cães e humanos. A COX-3 é seletivamente inibida pelo paracetamol e dipirona, sendo também inibida por aspirina e diclofenaco (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A descoberta da COX-3 parece responder um enigma farmacológico antigo, que é o mecanismo de ação do paracetamol. De fato, já em 1972, Flower e Vane postularam a existência no cérebro de cães de uma COX que apresentava maior sensibilidade para o paracetamol do que a COX presente no baço de coelhos (FLOWER; VANE, 1972). Entretanto, apesar desses achados iniciais, ainda são necessários estudos adicionais para esclarecer o papel da COX-3 em eventos fisiopatológicos.

Além do envolvimento em processos inflamatórios, a COX-2 também tem sido implicada em crescimento e formação tumoral (OSHIMA *et al.*, 2001), sugerindo que os inibidores seletivos da COX-2 podem ter uma nova indicação terapêutica. Entretanto, o uso crônico desses agentes tem sido associado com um aumento do risco de doenças cardiovasculares. Esses achados sugerem que COX-2, além de desempenhar um papel chave na fisiopatologia da inflamação e da carcinogênese, também está envolvida na manutenção de funções fisiológicas essenciais no sistema cardiovascular e no rim (MEAGHER, 2004).

As principais alterações inflamatórias observadas na periodontite são: eritema gengival, edema e reabsorção óssea, mediadas por ações diretas das PG, particularmente aquelas da série E (PGE<sub>2</sub>) (CHOI *et al.*, 2005). De fato, estudos sugerem que a concentração de PGE- 2 no fluido gengival pode ser utilizada como um marcador da

periodontite (CHOI *et al.*, 2005). Ainda, as PGs estão envolvidas no recrutamento de osteoclastos estimulados por IL-1, podendo afetar as células progenitoras dos mesmos, além de promover sua diferenciação (WANG *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores sugerem que o principal efeito de PGE2 sobre a reabsorção é através da regulação positiva do receptor ativador do NF- $\kappa$ B, expressão do ligante RANKL e pela inibição da expressão da OPG em células osteoblásticas (BLACKWELL *et al.*, 2010).

Uma das maneiras de se inibir a síntese de PG é através da inibição da COX pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Esses agentes são usados como adjuvantes na terapia periodontal, e alguns autores sugerem que a capacidade dos AINEs de reduzir a reabsorção óssea da periodontite se deve à inibição de PGE2. Neste sentido, nosso grupo demonstrou que indometacina (inibidor não seletivo da COX) e meloxicam (inibidor preferencial de COX-2) reduziram a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite em ratos (BEZERRA *et al.*, 2000). Embora a reabsorção óssea pareça ser reduzida pelos AINEs, sua completa inibição não acontece (PAQUETTE *et al.*, 2000). Essa observação está de acordo com as evidências que implicam outros mediadores (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17) na fisiopatologia da periodontite, os quais são frequentemente dependentes da presença de PGE2, sugerindo que a atuação conjunta desses mediadores deve ser mais importante que a ação isolada de cada um desses (RUWANPURA *et al.*, 2004). De forma interessante, demonstrou-se que IL-1 $\beta$  induz a produção de PGE2 em fibroblastos e outras células do tecido conjuntivo, o que levaria à expressão e ativação de genes para MMP. Se a produção de PGE2 é inibida, não haveria efeitos sobre a expressão dos genes das MMP. Este pode ser um mecanismo pelo qual os AINES retardariam a degradação de osso e colágeno (WANG *et al.*, 2005).

De acordo com Grenier *et al.* (2002), os AINEs inibem a formação de prostaglandinas, incluindo a PGE2. O nível de PGE2 tem sido observado aumentado na periodontite comparado com pacientes saudáveis, mas os estudos mostraram um aumento na perda de massa óssea e risco de fratura em pacientes que usaram AINEs (VESTERGAARD *et al.*, 2012; RICHARDS *et al.*, 2006). Outro AINE, celecoxib (inibidor da COX-2), pode ser um tratamento adjuvante eficaz em conjunto com raspagem e alisamento radicular para reduzir progressiva perda de inserção em indivíduos com periodontite crônica. O efeito benéfico da droga persistiu até aos 6 meses pós-administração. No entanto, dado o aumento de riscos cardiovasculares associados com o uso desta droga, vem sendo utilizada sob estrita observação às diretrizes de dosagem e administração (YEN *et al.*, 2008). Vários tratamentos e

estratégias têm sido desenvolvidas para atingir a resposta do hospedeiro na periodontite. Os inibidores de MMP, tais como doxiciclina (GAPSKI *et al.*, 2004), e inibidores farmacológicos de NF -kB e p38 estão sendo ativamente desenvolvidos para gerenciar doenças ósseas inflamatórias (ADAMS *et al.*, 2001).

O principal objetivo da terapia periodontal é controlar a lise óssea de tal forma que a destruição progressiva do periodonto possa ser inibida ou, pelo menos, reduzida. Neste sentido, considerando-se o aspecto multifatorial da etiopatogenia da periodontite, envolvendo a presença do agente infeccioso (biofilme periodontopatogênico) e a resposta imune-inflamatória do hospedeiro, a modulação dessa resposta juntamente com o controle bacteriano representa um conceito crescente dentre as abordagens terapêuticas da periodontite.

### **3.6 USO DE PRODUTOS NATURAIS PELAS COMUNIDADES: OPÇÃO TERAPÊUTICA NA PERIODONTITE.**

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. O semi-árido nordestino é considerado uma área com características sociais, econômicas e ecológicas bem particulares, uma vez que o sertanejo sobrevive, muitas vezes, à custa dos recursos bióticos para suprir suas necessidades, inclusive de medicamentos. Um estudo realizado pela SOS FARMA no Brasil revela que 91,9% das famílias utilizam plantas com fins terapêuticos e que 46,6% destas famílias cultivam essas plantas em seus próprios quintais (MARTINS *et al.*, 2012). A OMS recomenda a prática do uso de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde como forma de diminuir os custos destes programas e ampliar o número de beneficiados, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento onde persistem os grandes bolsões de pobreza (BIESKI, 2004).

Embora a flora brasileira represente mais de 20% das espécies vegetais conhecidas no mundo, ainda se observa uma subutilização deste potencial como fonte de novas moléculas, e seu consumo está normalmente associado com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tendo seu uso e indicação respaldados apenas pela própria comunidade (VEIGA JÚNIOR, 2005).



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 e o desenvolvimento sustentável de uma terapêutica alternativa e complementar.

De fato, a identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento como o Brasil, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos de baixo custo, seguros e com embasamento científico, mediante a realização de pesquisas que comprovem suas propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas (CALIXTO *et al.*, 2000).

### 3.7 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

#### **Família Rubiaceae**

A espécie *Tocoyena sellowiana* está classificada taxonomicamente no gênero *Tocoyena*, pertencente à família Rubiaceae. A família Rubiaceae, descrita pela primeira vez em 1789 pelo botânico francês Jussieu, tem o seu nome *Rubia*, do latim, associado a “ruiva dos tintureiros” devido à presença de uma substância vermelha denominada de jenipina (RENNÓ, 1963). É a quarta maior família botânica dentre as angiospermas, (DELPRETE, 2004 apud CONSOLARO, 2008) sendo superada somente pelas Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae, e a maior da ordem Gentianales, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies (ROVA *et al.*, 2002; KAROU *et al.*, 2011). Sua área de distribuição geográfica compreende principalmente as regiões tropicais e subtropicais atingindo, também, as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (JUDD; CAMPBELL; KELLOGG, 2008).

No Brasil, de acordo com Souza & Lorenzi (2008) ocorrem 120 gêneros e 2.000 espécies de Rubiaceae, sendo considerada uma das principais famílias da flora amplamente distribuída nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado, predominando sob a forma de árvores e semi-arbustos (BOLZANI *et al.*, 2001), constituindo-se uma das principais da flora brasileira (SOUZA; LORENZI, 2005), de hábitos essencialmente tropicais.

Os representantes dessa família apresentam hábitos variados como árvores, arbustos, ervas eretas ou reptantes, trepadeiras herbáceas volúveis, lianas, terrícolas ou raramente epífitas ou aquáticas (ROBBRECHT, 1988; DELPRETE; SMITH; KLEIN, 2004; SOUZA; LORENZI, 2008).

Segundo Taylor e colaboradores (2007), a família pode ser facilmente reconhecida em campo devido às suas folhas simples, geralmente opostas cruzadas e pela presença de estípulas interpeciolares. A maioria das espécies são árvores de pequeno porte ou arbustos muito frequentes no subosque.

De acordo com a classificação botânica realizada por Robbrecht em 1988, a família Rubiaceae encontra-se atualmente dividida em quatro subfamílias: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Rubioideae

A família Rubiaceae possui espécies de grande importância econômica, as quais são exploradas como alimentícias, a saber, *Coffea arabica* L. (café), *Genipa americana* L. (jenipapo) e ornamentais *Ixora spp.*, *Mussaenda spp.*, *Gardenia spp.* Alguns representantes dessa família destacam-se também na indústria farmacêutica como *Cinchona pubescens* Vahl, rica em quinina, utilizada na medicina popular e na fabricação de fitoterápicos para o tratamento da malária (OLIVEIRA, 2009), e *Uncaria tomentosa* e *Mitragyna speciosa* Korth, que contêm alcalóides indólicos, e são utilizadas tradicionalmente como analgésicos e/ou anti-inflamatórios (PISCOYA *et al.*, 2001).

Além disso, estudos farmacológicos são relatados para 14 espécies, destacando-se atividades anti-sifilíticas, anti-asmática, anti-anêmica, anti-angiogênica, anti-inflamatória, anti-tumoral e anti-oxidante. Entretanto, a literatura ainda carece de estudos que revelem as substâncias químicas responsáveis pelas ações farmacológicas, pois o conhecimento acerca da maioria das espécies restringe-se a dados empíricos e etnofarmacológicos (GAZDA, 2004).

### **O Gênero *Tocoyena* e Espécie *Tocoyena sellowiana***

O gênero *Tocoyena* (família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae) possui cerca de 30 espécies, representado por árvores de pequeno porte ou arbustos, típicas do Cerrado (BOLZANI *et al.*, 1996; BOLZANI *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2004).



**Figura 2: Ilustração de *Tocoyena sellowiana*: Fonte: Google.**

As plantas deste gênero apresentam capacidade biogenética para produzir substâncias com grande diversidade estrutural, tais como iridoídes glicosilados e não glicosilados, saponina triterpênica derivada do ácido quinóvico e flavanol glicosilado. Além de iridoídes, plantas deste gênero são ricas em flavonoides, triterpenos, derivados fenólicos e alcaloides do tipo emetínicos, quinolínicos e poliindolenínicos (COELHO *et al.*, 2006). Ademais, dados da literatura mostram que plantas do gênero *Tocoyena* apresentam atividade antiviral (SALEEM *et al.*, 2001), antifúngica (BOLZANI *et al.*, 1997; COELHO *et al.*, 2006), atividade estimulante em útero de ratas (BARROS *et al.*, 1970), e anti-inflamatória (RIBEIRO; CUNHA, 2004).

*Tocoyena sellowiana*, popularmente conhecida por "genipapo bravo" é utilizada como anti-inflamatório em contusões (RIBEIRO; CUNHA, 2004; KOO *et al.*, 2004) na Serra da Ibiapaba - CE. A literatura relata o isolamento de compostos de *Tocoyena sellowiana* como: o ácido quinóvico (HAMERSKI *et al.*, 2005), também a forma glicosilada deste ácido (TAPONDJOU *et al.*, 2002), ácido cinchólico (HAMERSKI *et al.*, 2005), ácido ursólico, ácido oleanoico (FALCÃO, FERNANDES, MENEZES, 2003), manitol, glicose etoxilala e saponina triterpênica. Ainda, a literatura relata atividade anti-inflamatória de compostos isolados de *Tocoyena sellowiana* como genipina, iridoíde (RIBEIRO *et al.*, 2006) e do ácido quinóvico (BABA *et al.*, 1992; RIBEIRO; CUNHA, 2004; COELHO *et al.*, 2006). Outros estudos demonstram que o glicosídeo do ácido quinóvico tem ação antiviral (AQUININO *et al.*, 1989).

O fracionamento cromatográfico das frações AcOEt e n-butanol, resultantes da partição do extrato etanólico da raiz, culminou no isolamento e caracterização de 8 substâncias. A determinação estrutural desses compostos foi realizada através de técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além de comparação com dados da literatura. Da fração AcOEt foram obtidas as substâncias de 1 a 5. A substância 1 foi caracterizada como o ácido quinóvico (HAMERSKI *et. al.*, 2005), e a substância 2 como a forma glicosilada deste ácido (TAPONDJOU *et al.*, 2002). Foram isolados também duas misturas, uma caracterizada como sendo os ácidos quinóvico (1) e cinchólico (3) (HAMERSKI *et. al.*, 2005), e a outra os ácidos ursólico (4) e oleanólico (5) (FALCÃO, FERNANDES, MENEZES, 2003).

Da fração n-butanol foram isoladas as substâncias 6, 7 e 8. A substância 6 foi identificada com sendo o carboidrato conhecido como manitol. O composto 7 foi caracterizado como sendo a glicose etoxilala, enquanto o composto 8 foi caracterizado como a saponina triterpênica 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-raminopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosil] ácido ursólico 28-O-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil] éster (SANTOS *et al.*, 2003).

Apesar de já existir na literatura compostos isolados do extrato etanólico da raiz de *Tocoyena sellowiana*, até o presente momento, não temos o fracionamento cromatográfico, resultante da partição do extrato etanólico da casca do caule, embora estudos estejam sendo realizado no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, sob a Coordenação da Profa. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque.

## 4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia e segurança do extrato etanólico da casca do caule de *Tocoyena sellowiana* em um ensaio pré-clínico de periodontite.

### 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a perda óssea alveolar observada aos 11 dias de periodontite em ratas;
- ✓ Identificar os efeitos de *Tocoyena sellowiana* sobre os achados histopatológicos da periodontite em ratas;
- ✓ Investigar o efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre os níveis de FAO em ratas submetidas à periodontite;
- ✓ Investigar o efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre os níveis PGE-2 no tecido gengival de ratas submetidas à periodontite;
- ✓ Investigar o efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre os níveis IL-1 $\beta$  no tecido gengival de ratas submetidas à periodontite;
- ✓ Identificar células produtoras de COX-2 por imunohistoquímica na maxila de ratas submetidas à periodontite;
- ✓ Investigar o efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre os níveis de MPO no tecido gengival de ratas submetidas à periodontite;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento de *Tocoyena sellowiana* sobre a integridade da mucosa gástrica após 11 dias de tratamento da periodontite em ratas;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração de *Tocoyena sellowiana* sobre parâmetros bioquímicos (Fosfatase alcalina total, Creatinina, AST/ ALT) e peso úmido dos órgãos.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. ANIMAIS

Foram utilizados noventa (90) ratos Wistars (*Rattus norvegicus albinus*) fêmeas, pesando entre 200 e 220 gramas, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC. Os animais foram colocados em caixas de plástico, a temperatura média de

20-24°C, respeitando o ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam água e ração *ad libitum*.

Os protocolos experimentais usados neste estudo foram submetidos à análise pela comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA- da Universidade Federal do Ceará, os quais foram aprovados e receberam número de protocolo (52/12). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais assim como o número de animais utilizados em acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e normas internacionais (Guide for care and use of laboratory animals- NIH publication 85- 23, revised 1985).

## 5.2. DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Ácido Fórmico;
- Água Destilada;
- Albumina sérica bovina (BSA);
- Álcool etílico 70 %;
- Anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA);
- Anticorpo primário de coelho, anti-PGE-2 e anti-IL- 1 $\beta$ , (Santa Cruz®)
- Azul de Metileno 1 %
- Cloreto de Sódio;
- 3,3`diaminobenzidine (DAB)
- Dietilpirocarbonato;
- EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético);
- Eosina (Merck);
- Formaldeído;
- Formol Tamponado;
- Hematoxilina;
- Hidrato de Cloral;
- Tribromoetanol 2,5 %

## 5.3. OBTENÇÃO DA *Tocoyena sellowiana*

O isolamento do extrato foi realizado no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral, sob a orientação da Professora

Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque, através de metodologias de rotina. A exsicata (n° 33.739), correspondente à coleta, encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

#### 5.4. MODELO EXPERIMENTAL

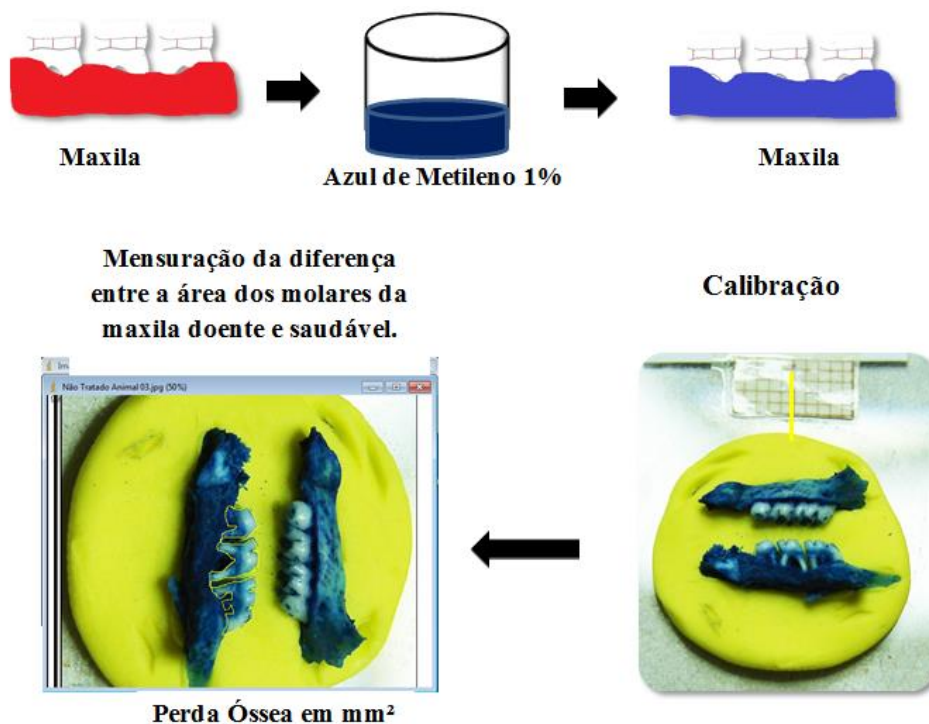
O modelo de periodontite experimental utilizado foi o padronizado pelo nosso grupo (BEZERRA *et al.*, 2000). Os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5 % (sigma- Aldrich) (1mL/100g). A periodontite foi induzida através da colocação cirúrgica de um fio de náilon (3-0) na cervical do segundo molar superior esquerdo.

Após adaptado, o fio teve suas pontas unidas por um nó voltado para a face vestibular, ficando localizado numa posição supragengival na vestibular e subgengival na face palatina. O grupo naive foi representado por animais mantidos nas mesmas condições ambientais, não submetidos a qualquer manipulação. O grupo não tratado foi representado por animais submetidos à indução da periodontite e administrado apenas solução salina. Grupo *Ts* 0,1 mg/kg animais submetidos à indução da periodontite e administrado *Tocoyena sellowiana* (0,1 mg/kg). Grupo *Ts* 1 mg/kg animais submetidos à indução da periodontite e administrado *Tocoyena sellowiana* (1 mg/kg). Grupo *Ts* 10 mg/kg animais submetidos à indução da periodontite e administrado *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg). Após a indução da periodontite os animais foram pesados diariamente para a construção de uma curva ponderal. Os animais foram eutanasiados, sob anestesia, após 11 dias, quando se removeu as hemiarcadas para análise morfométrica, histopatológica e para análise de imunohistoquímica. O tecido gengival foi coletado para detectar os níveis de PGE2 e IL-1 $\beta$  após 11 dias de tratamento. Para mensuração de MPO foi coletado tecido gengival na 6<sup>o</sup> hora após a indução da periodontite (MENEZES *et al.*, 2012). Também foi coletado sangue para as dosagens bioquímicas séricas (ALT, AST, FAT, FAO, creatinina) e retirados alguns órgãos para análise histopatológica (estômago, fígado, rim e coração).

## 5.5. PARÂMETROS AVALIADOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

### 5.5.1. PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Após a eutanásia dos animais, as maxilas foram removidas e fixadas em formol (10 %) por 24 horas e coradas com azul de metileno (1 %) a fim de discriminar o tecido ósseo dos dentes, os quais foram corados com menor intensidade. Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarquadas foram montadas em blocos de cera de abelha e fotografadas em alta resolução (Cyber Short Sony, Zoon óptico 12x). As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do software Image J® para a quantificação da perda óssea alveolar. A perda óssea alveolar foi obtida a partir do cálculo da diferença entre as medidas das áreas vestibulares dos molares com periodontite e as áreas vestibulares dos molares contralaterais saudáveis. Essa área foi inicialmente calculada em pixels posteriormente convertidas em mm<sup>2</sup> pelo uso de um padrão de milímetros fixado ao lado das maxilas (LIMA *et al.*, 2004). A análise da reabsorção do osso alveolar foi realizada por um observador cego para cada experimento.



**Figura 3:** Esquema ilustrativo da análise da perda óssea alveolar após indução da periodontite. A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. Após a eutanásia dos animais as hemiarquadas foram removidas e coradas com azul de metileno (1%). A análise da reabsorção do osso alveolar foi realizada por um observador cego para cada experimento. Foi mensurada a diferença entre as áreas em pixels das superfícies vestibulares dos molares esquerdos (com periodontite) e direito (controle saudáveis), através do *software* ImageJ®. Fonte: Adaptado de SOUSA, 2011



### 5.5.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A histopatologia do osso alveolar foi feita em cortes seriados das hemiarçadas com periodontite. Após fixação em formol a 10%, as hemiarçadas foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 7% e trocadas a cada 24 horas por um período de 3 dias. A partir daí, o material foi lavado em água corrente por 1 hora e colocado em álcool 70%, até a data de serem processados para inclusão em parafina. Após o processo de inclusão foram feitos cortes seriados vestibulo-linguais (5 µm) seguindo-se coloração pela hematoxilina-eosina (H&E).

A análise semi-quantitativa das lâminas processadas foi feita por um único observador em momentos distintos, avaliando as regiões entre os 1º e 2º molares verificando a presença de infiltrado celular e osteoclastos, e estado de preservação do cemento e processo alveolar. A análise histopatológica foi realizada pela Professora Dra. Karuza Maria Alves Pereira, da Universidade Federal do Ceará, adaptada de acordo com os critérios histopatológicos previamente estabelecidos por Brito *et al* in Bezerra *et al.*, 2000 (Vide Abaixo):

**Tabela 1: Escores e critérios histopatológicos para análise da periodontite**

Escore	Características
<b>Grau 0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Infiltrado celular ausente ou discreto</li> <li>•Escassos/raros osteoclastos de permeio</li> <li>•Processo alveolar preservado</li> <li>•Cemento preservado</li> </ul>
<b>Grau 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Infiltrado celular leve com alguns osteoclastos</li> <li>•Pequena absorção do processo alveolar</li> <li>•Cemento preservado</li> </ul>
<b>Grau 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Infiltrado celular moderado</li> <li>•Processo alveolar com digestão acentuada e presença de grande número de osteoclastos</li> <li>•Destruição parcial do cemento</li> </ul>
<b>Grau 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Infiltrado celular acentuado</li> <li>•Presença de número aumentado de osteoclastos</li> <li>•Processo alveolar e cemento ausentes</li> </ul>

### **5.5.3. DOSAGEM SÉRICA DA VARIAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA**

Amostras de sangue foram coletadas da cauda de ratas anestesiadas antes da indução da periodontite e no 11º dia (dia da eutanásia). O sangue foi centrifugado (1800 g x 10 min.), e o sobrenadante foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a análise bioquímica. Parte das amostras foi utilizada para a dosagem da fosfatase alcalina total dos animais, utilizando-se o kit específico, cuja metodologia seguida foi conforme orientação do laboratório fabricante (LABTEST®, referência 79, MG, Brasil).

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

### **5.5.4. DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2)**

Aos 11 dias de periodontite, após a eutanásia dos animais, realizou-se a coleta do tecido gengival para a dosagem de PGE2 que foi realizada pelo método de ELISA, usando o kit (R&D Systems®, Kit Parameter™ PGE2 Assay, catálogo PKGE004B, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a placa de 96 poços foi incubada por 1h à temperatura ambiente no agitador horizontal com 200  $\mu\text{L}$ /poço com o diluente RD5-56 para os poços de ligação não específica e 150  $\mu\text{L}$ /poço do mesmo diluente para o padrão zero (0) mais 50  $\mu\text{L}$ /poço do anticorpo primário em todas as amostras exceto os poços de ligações não específicas. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$ /poço do conjugado de PGE2 para toda a placa e incubada novamente por mais duas horas à temperatura ambiente e no agitador horizontal. Após as duas horas, a placa foi lavada três vezes com 400  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e adicionado 200  $\mu\text{L}$ /poço da solução substrato e incubada por 30 minutos, sendo a placa protegida da

luz. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de parada em cada poço e a absorvância foi medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

#### **5.5.5. DOSAGEM DE INTERLEUCINA 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

Aos 11 dias de periodontite, após a eutanásia dos animais, realizou-se a coleta do tecido gengival para a dosagem de IL-1 $\beta$  que foi realizada pelo método de ELISA, usando o kit (R&D Systems®, Kit Quantikine\_rat IL-1 $\beta$  immunoassay, catálogo RLB00, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a placa de 96 poços foi incubada por 2h à temperatura ambiente com 50  $\mu$ L/poço com as soluções padrão, amostra e controle e com o diluente de ensaio RD1-54 para IL-1 $\beta$ . Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com 400  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubada novamente por mais duas horas com 100  $\mu$ L de conjugado de IL-6 por poço. Após as duas horas, a placa foi lavada novamente e incubada por mais 30 minutos com 100  $\mu$ L da solução substrato, sendo a placa protegida da luz. Em seguida foi adicionada a placa 100  $\mu$ L da solução de parada em cada poço e a absorvância foi medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

#### **5.5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA**

Para realização de imunohistoquímica, os espécimes foram novamente submetidos a cortes de 4  $\mu$ m de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Luis, MO, EUA).

Os cortes foram submetidos ao anticorpo anti-COX-2, utilizando método de estreptavidina-biotina. Resumidamente, a técnica consistiu nos seguintes passos: os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados em xilol (três banhos durante 5 minutos cada), imersos em três passagens de álcool absoluto, lavados em água corrente e, posteriormente, foi submetido a uma passagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0 em panela pressurizada (Pascal), a  $\pm$  22-25 PSI, durante 30 segundos à temperatura de 126°C. Após retornar à temperatura ambiente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-COX-2, (ABCAM®), overnight à temperatura

ambiente, na diluição de 1:300 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA), e, posteriormente, lavados com solução de PBS.

Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita incubação em solução cromógena preparada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durante 5 minutos em câmara escura. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, porém o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%. Os cortes foram então lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, seguida de desidratação em uma série de concentrações de álcool, diafinizadas em xilol e, por fim, a lâmina foi colocada. Como controle positivo foi utilizado corte da maxila que foi submetido ao mesmo protocolo.

As lâminas foram avaliadas em microscópio NIKON Eclipse E200, e fotografadas em microscópio LEICA acoplado a computador.

Os parâmetros de positividade da marcação imunohistoquímica do antígeno em todos os cortes incluídos consistiu nas células que exibiram coloração acastanhada no seu citoplasma, independente da intensidade de imunomarcação.

#### **5.5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE**

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. Para tanto, 50 mg de tecido gengival, depois de pesados, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por mL) e posteriormente homogeneizados em um Politron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por BRADLEY *et al.*, 1982 utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine

em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como Atividade de MPO/mg de tecido (BRADLEY *et al.*, 1982).

## 5.6. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Trinta minutos após o tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg *per os*) os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5 % (Sigma) (1mL/100g) e então se seguiu a indução da periodontite. A partir daí os animais foram tratados diariamente, sempre no mesmo horário com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg *per os*) ou solução salina durante 11 dias. Depois dos 11 dias de tratamento os animais foram eutanasiados sob anestesia, para remoção das hemiarcadas para análise morfométrica, histopatológica e para avaliação imunohistoquímica. O tecido gengival foi coletado para detectar os níveis de PGE2 e IL-1 $\beta$  após 11 dias de tratamento. Para mensuração de MPO foi coletado tecido gengival na 6<sup>o</sup> hora após a indução da periodontite (MENEZES *et al.*, 2012). Também foi coletado sangue para as dosagens bioquímicas séricas (ALT, AST, FAT, FAO, creatinina) e retirados alguns órgãos para análise histopatológica (estômago, fígado, rim e coração).

## 5.7. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS

### Curva Ponderal

A massa corpórea foi medida (g) diariamente desde o tempo zero (antes da indução da periodontite até 11 dias de periodontite). Os valores encontrados foram expressos como variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

### Efeitos sistêmicos do tratamento com *Tocoyena sellowiana* em ratas submetidas à periodontite experimental.

Após 11 dias de tratamento com *Tocoyena sellowiana* os animais foram anestesiados, e amostras de sangue foram coletadas a partir do ventrículo direito e centrifugados para posterior dosagem de fosfatase alcalina total, creatinina, alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST).

Em seguida os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia, seguido da retirada e pesagem dos órgãos (rim, fígado e coração), mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas. Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados aos de animais normais que receberam apenas solução salina (NaCl 0,15 M), nas mesmas condições que os animais tratados.

### **Dosagem de fosfatase alcalina total**

A fosfatase alcalina total é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas das células dos túbulos renais, ossos (osteoblastos), placenta, trato intestinal e fígado.

Portanto, a fosfatase alcalina encontrada no soro é resultado da presença de diferentes isoenzimas originadas em diferentes órgãos, com predomínio das frações ósseas e hepáticas. Para a dosagem de fosfatase alcalina, utilizou-se o kit comercial (Labtest®, referência 79, MG, Brasil), cuja metodologia baseia-se na Reação de Bowers e McComb modificado (substrato *p*-nitrofenilfosfato).

O procedimento constitui em adicionar 800 µl do reagente número 1 (contém tampão pH 10,4, HEDTA 2,0 mmol/L, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, actato de magnésio 2,5 mmol/L, azida sódica 8 mmol/L) a 200 µL do reagente número 2 (contém *p*-nitrofenilfosfato > 60 mmol/L, fenol >50 mmol/L) e 20 µl da amostra (soro), as absorbâncias foram lidas a 405 nm, em analisador bioquímico semi-automático Bioplus BIO-200F.

### **Dosagem de creatinina**

A constância na formação e excreção da creatinina faz dela um marcador muito útil da função renal, principalmente da filtração glomerular, em virtude de sua relativa independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismos proteico. Assim, a determinação da creatinina plasmática é um marcador de função renal mais seguro do que a uréia. Para a dosagem de creatinina, utilizou-se o kit comercial (Labtest®, referência 96, MG, Brasil), cuja metodologia baseia-se na Reação de Jaffé; Picrato sem Precipitação. O procedimento constitui em adicionar 0,8 mL de NaOH (solução de hidróxido de sódio 200 mmol/L), 0,2 mL de ácido pícrico (contém 22,2

mmol/L de ácido pícrico) e 50 µL da amostra. Em seguida as absorvâncias foram lidas em 510 nm em analisador semi-automático Bioplus BIO-200F.

### **Dosagem de AST e ALT**

A enzima AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias e, portanto, sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo. Do mesmo modo, a enzima ALT é encontrada abundantemente no fígado, em quantidade moderada nos rins e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática, tornando-a um marcador sensível da função do fígado. Portanto, suas mensurações podem ser um indicador de comprometimento hepatocelular agudo. Para a dosagem de AST e ALT, utilizou-se o kit comercial (Labtest®, referência 109 e 108 respectivamente, MG, Brasil), as metodologias baseiam-se em Cinética UV-IFCC.

O procedimento para a dosagem da enzima AST consistiu em adicionar 800 µL do reagente número 1 (contém Tampão Tris 105 mmol/L, L-aspartato 330 mmol/L, MDH > 825 U/L, LDH > 1200 U/L e azida sódica 0,095%), 200 µL do reagente número 2 (contém Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320 µmol/L, α-cetoglutarato 66 mmol/L e azida sódica 0,095%) e 100 µL da amostra. As absorvâncias foram lidas a 340 nm, em analisador semi-automático Bioplus BIO-200F. Para a dosagem de ALT, o procedimento para a dosagem da enzima ALT consistiu em adicionar 800 µL do reagente número 1 (contém Tampão Tris 132,5 mmol/L, L-alanina 687,5 mmol/L, LDH > 2300 U/L e azida sódica 0,095%), 200 µL do reagente número 2 (contém Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320 mmol/L, cetoglutarato 82,5 mmol/L e azida sódica 0,095%) e 100 µL da amostra. As absorvâncias foram lidas a 340 nm, em analisador bioquímico Bioplus BIO-200F.

### **5.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO, RIM, CORAÇÃO**

Para avaliar possível efeito lesivo ao parênquima hepático, renal e tecido cardíaco, os animais submetidos à administração de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1;10 mg/kg), os animais do grupo não tratado e naive, tiveram seus órgãos removidos no

momento da eutanásia, para posterior análise histopatológica. Estes órgãos foram fixados em formol tamponado 10% durante 24h, sendo, depois, embebido em parafina. Seções de 5 µm de espessura foram desparafinizadas, coradas em hematoxilina-eosina (H&E), e examinadas em microscópio óptico.

## **5.9. ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA**

Para avaliar possível efeito lesivo à mucosa gastroduodenal, os animais submetidos à administração de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1;10 mg/kg), os animais do grupo não tratado e naive, tiveram seus estômagos removidos no momento da eutanásia, abertos pela grande curvatura e lavados com salina (0,9 %). A porção glandular dos estômagos foi fixada em formol tamponado 10% durante 24h, sendo, depois, embebida em parafina. Seções de 5 µm de espessura foram desparafinizadas, coradas em hematoxilina-eosina (H&E), e examinadas em microscópio óptico. Os espécimes foram avaliados de acordo com o critério de Laine (1988). Segmentos de 1 cm de cada secção histológica foram avaliados para perda de células epiteliais (escore: 0–4), edema na mucosa (escore: 0–4), lesão hemorrágica (escore: 0–4) e infiltrado celular (escore: 0-3).

## **5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni, adotando-se o nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

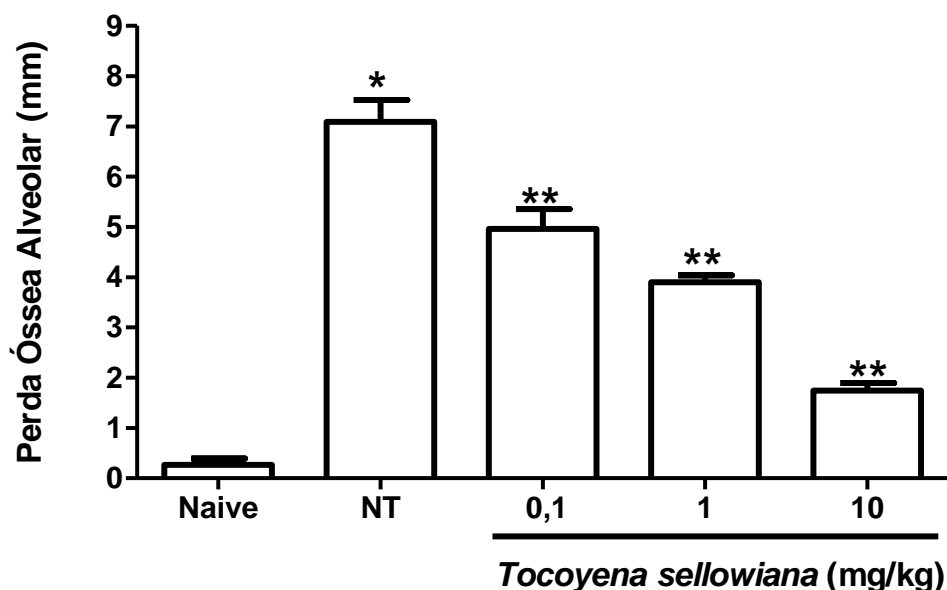
Para análise histopatológica, os dados foram expressos em mediana e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism (versão 5.0).



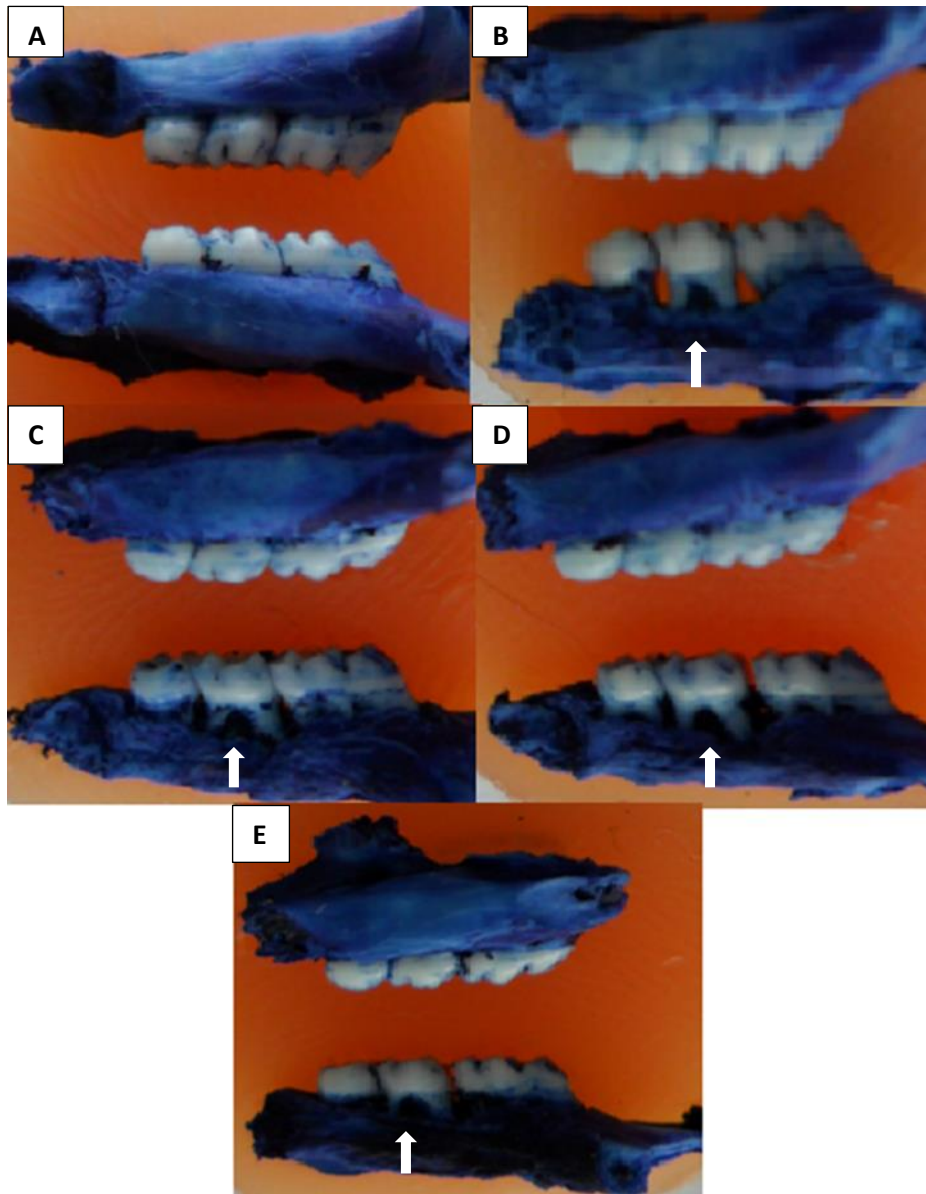
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Eficácia de *Tocoyena sellowiana* sobre a perda óssea alveolar no modelo de periodontite em ratas

Os animais submetidos à indução da periodontite (grupo não tratado) apresentaram maior perda óssea alveolar, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo naïve aos 11 dias de periodontite (**Figura 4**). O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/ kg; *per os*) inibiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a perda óssea alveolar observado aos 11 dias de periodontite quando comparado ao grupo não tratado, com redução de 30%; 45,1% e 75,4%, respectivamente (**Figura 4**). A **figura 5B** ilustra que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a periodontite, reproduzindo os principais sinais clínicos da doença tais como: reabsorção óssea alveolar, exposição de raízes e perda de contato interdental, quando comparado aos animais sem periodontite (**Figura 5A**). Ainda, observa-se a redução da perda óssea nos grupos tratados com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/ kg) (**Figura 5C, 5D e 5E**, respectivamente).



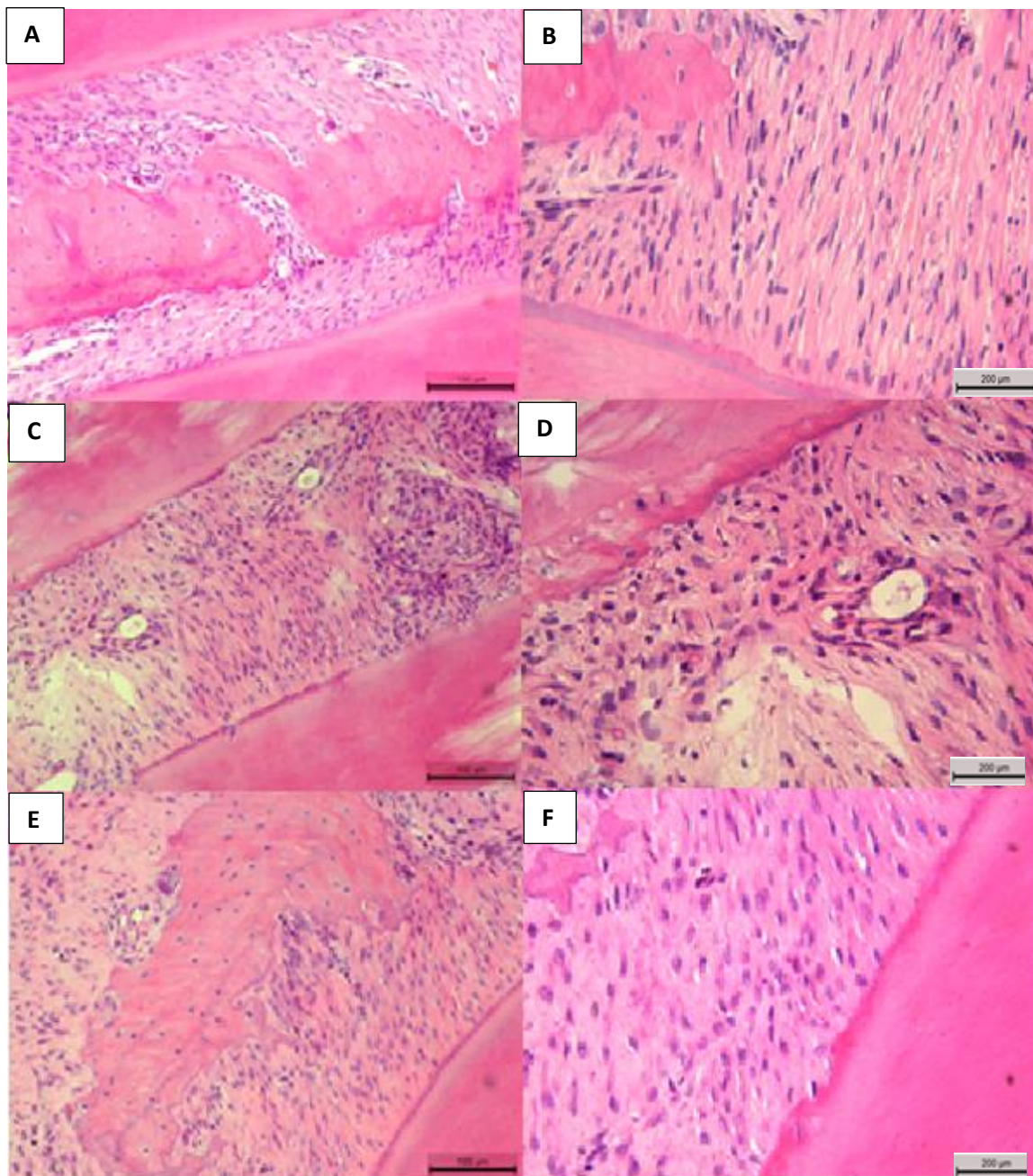
**Figura 4: Efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre a perda óssea alveolar em ratas submetidas à indução de periodontite experimental.** A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg; v.o.) foi administrada durante 11 dias. Para análise da Perda Óssea Alveolar as maxilas foram removidas aos 11 dias de periodontite, dissecadas, fixadas (formol 10%), coradas (Azul de metileno 1%) montadas em blocos de cera de abelha e fotografadas em alta resolução (Cyber Shot Sony DSC-H2). As imagens digitalizadas foram analisadas por meio de software específico (ImageJ®) para quantificação da perda óssea. A Perda Óssea Alveolar foi obtida a partir do cálculo da diferença entre as medidas das áreas das hemiarcadas esquerda (com indução da doença) e direita (sem indução da periodontite). Os dados representam média  $\pm$  EPM (n=7 para cada tratamento), \* $p < 0,05$  versus naive; \*\* $p < 0,05$  versus não tratado (NT), (ANOVA; Bonferroni).



**Figura 5: Fotografia ilustrativa da maxila de ratas (face vestibular) submetidas à indução da periodontite e tratadas com *Tocoyena sellowiana*.** Os animais receberam (*per os*) *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (salina) 30 minutos antes da indução da periodontite, e a partir daí, diariamente durante 11 dias. Os animais foram eutanasiados, sob anestesia, 11 dias após indução da periodontite, sendo as hemiarcadas esquerdas removidas e coradas com azul de metileno (1%). **A:** Maxila de animal não submetido à indução da periodontite (naive). **B:** Maxila de animal aos 11 dias de periodontite e que recebeu apenas o veículo (grupo não-tratado). **C:** Maxila de animal aos 11 dias de periodontite e tratado (*per os*) diariamente com *Tocoyena sellowiana* (0,1 mg/kg). **D:** Maxila de animal aos 11 dias de periodontite e tratado (*per os*) diariamente com *Tocoyena sellowiana* (1 mg/kg). **E:** Maxila de animal aos 11 dias de periodontite e tratado (*per os*) diariamente com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg; *per os*). As setas brancas indicam as áreas de reabsorção óssea alveolar.

## **6.2. Efeito de *Tocoyena sellowiana* sobre as alterações histopatológicas observadas no modelo de periodontite em ratas**

A análise histopatológica qualitativa realizada aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos das ratas do grupo não tratado revelou a presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção do processo alveolar com destruição parcial do cemento e presença de osteoclastos (**Figura 6C e D**). Por outro lado, a análise histopatológica realizada aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos das ratas tratadas com *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg) mostrou infiltrado celular inflamatório discreto, preservação parcial do processo alveolar e cemento preservado (**Figura 6E e F**). O grupo naive, apresentou estruturas preservadas (**Figura 6A e B**). A **tabela 2** ilustra os escores obtidos após análise histopatológica qualitativa das hemiarquadas das ratas aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos.



**Figura 6: Microfotografia da maxila de ratas 11 dias após indução da periodontite e tratadas com *Tocoyena sellowiana*.** A periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores esquerdos. **A e B.** Periodonto de animal não submetido à indução da periodontite (naive) (100x e 400x, respectivamente); **C e D.** Periodonto de animal submetido à indução da periodontite e tratado apenas com o veículo (grupo não tratado), apresentando intenso infiltrado celular inflamatório, reabsorção do osso alveolar e cimento 100x e 400x, respectivamente); **E e F.** Periodonto de animal submetido à indução da periodontite e tratado (*per os*) com *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg), onde se observa infiltrado celular inflamatório leve, discreta reabsorção do osso alveolar com preservação do cimento (100x e 400x, respectivamente).

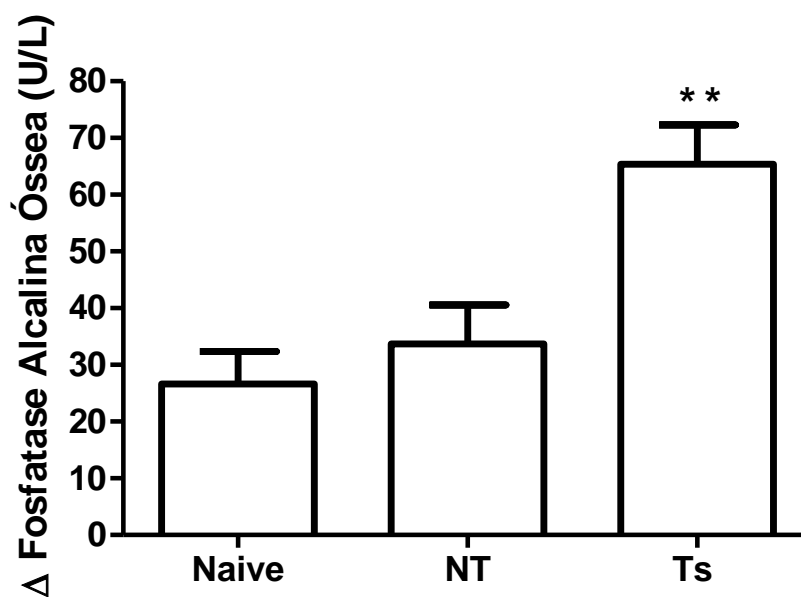
**Tabela 2: Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a análise histopatológica (H&E) da maxila de ratas submetidas à periodontite**

	<i>Tocoyena sellowiana</i> (Ts)				
	Naive	Não tratado	0,1	1	10
<b>Escores</b>	<b>0 (0-0)</b>	<b>2 (1-3)*</b>	<b>2 (1-2)*</b>	<b>1 (1-2)*</b>	<b>1 (0-2)**</b>

\*p< 0,05 em relação ao grupo naive; \*\*p< 0,05 em relação ao grupo não tratado (Kruskal-Wallis; Dunn's).

### 6.3. Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO) em ratas submetidas à periodontite

Em animais com periodontite que foram tratados com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg), houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da variação da FAO em relação aos grupos naive e não tratado (**Figura 7**).



**Figura 7:** Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO) em ratas submetidas à periodontite. O sangue foi coletado da cauda dos animais antes da indução da periodontite e no dia da eutanásia. Foram realizadas as dosagens de FAO inicial e final do soro obtido a partir do sangue coletado. Observou-se um significativo aumento da variação da FAO nos animais que receberam *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg). As barras representam a média  $\pm$ EPM da diferença entre as dosagens de FAO final e inicial ( $\Delta$ ). <sup>\*\*</sup>  $p < 0,05$  em relação aos grupos naive e não tratado (ANOVA, Bonferroni).

#### **6.4. Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a produção de prostaglandina (PGE2) em tecido gengival de ratas submetidas à periodontite**

As ratas submetidas à periodontite e tratadas (*per os*) com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de PGE2 quantificados nos tecidos gengivais, quando comparado ao grupo não tratado (**Figura 8A**).

#### **6.5. Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a produção de interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) em tecido gengival de ratas submetidas à periodontite**

As ratas submetidas à periodontite e tratadas (*per os*) com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de IL-1 $\beta$  quantificados nos tecidos gengivais, quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 8B**).

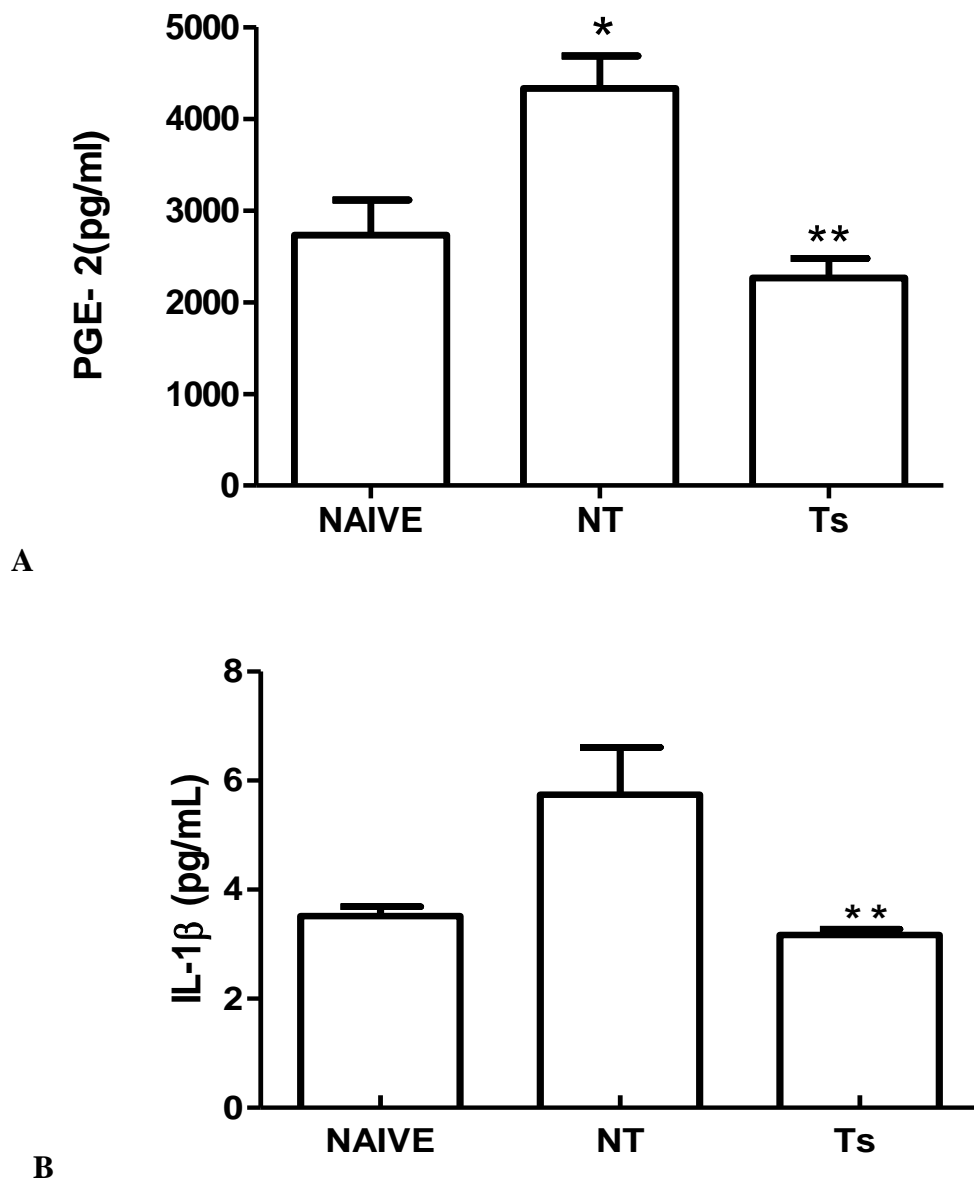
#### **6.6. Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a imunomarcção para COX-2.**

Observou-se acentuada marcação imunohistoquímica para COX-2 nas células do periodonto, especialmente fibroblastos (setas), aos 11 dias de periodontite nas ratas no grupo não tratado (salina) (**Figuras 9B**). O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) reduziu a intensidade e a área de marcação quando comparado ao grupo não tratado (**Figuras 9C**).

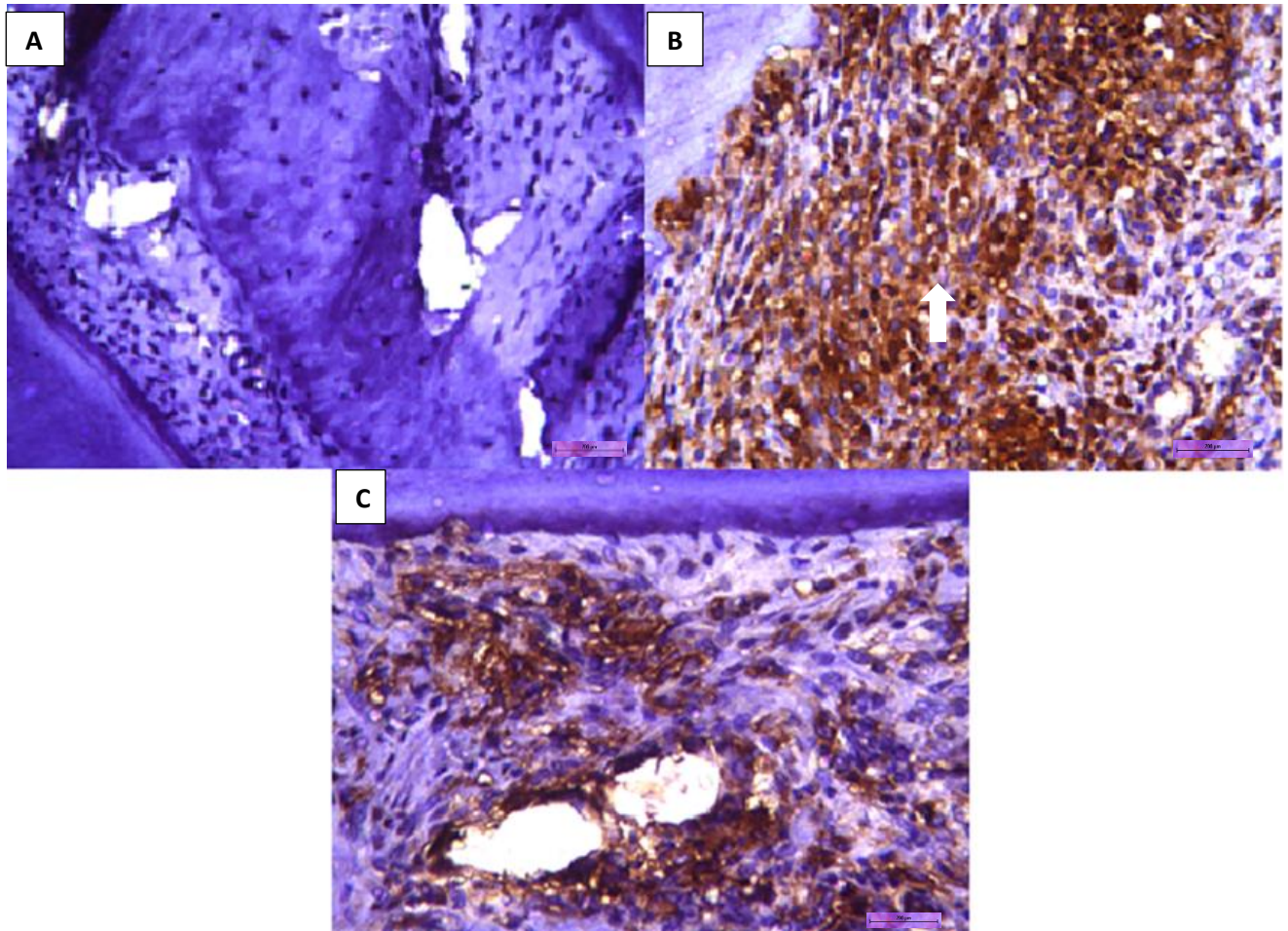
#### **6.7. Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a medida de atividade de mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas.**

A MPO é uma enzima que está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e pode ser considerada um indicador de neutrófilos no tecido (BRADLEY *et al.*, 1982). Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade da MPO na 6<sup>o</sup> hora após a indução da periodontite no grupo não tratado quando comparado ao grupo naíve. *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) diminuiu a atividade de MPO ( $p < 0,05$ ), indicando redução da quantidade de neutrófilos no tecido, sendo estatisticamente diferente do grupo não tratado (**Figura 10**).

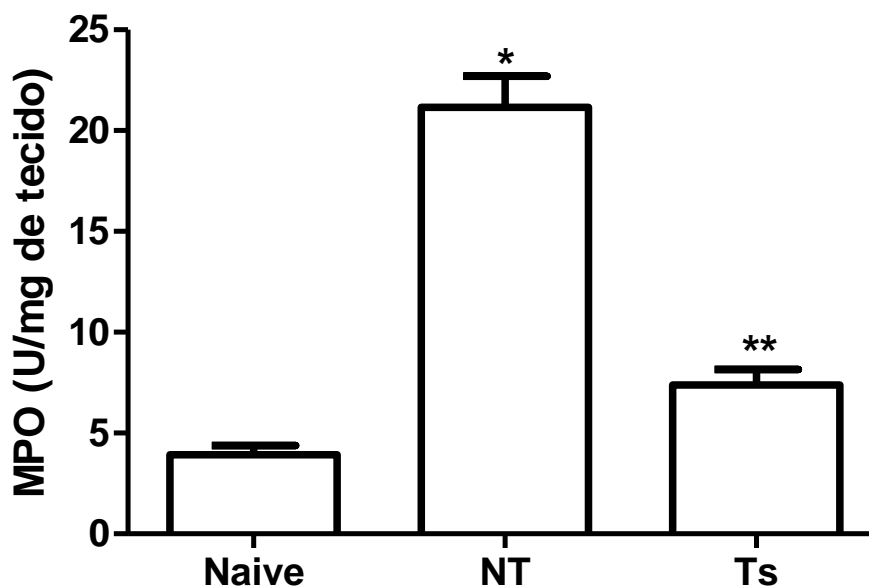




**Figura 8:** Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em tecido gengival de ratas submetidas à periodontite. A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical do segundo molar superior esquerdo. *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg) ou salina foram administradas (*per os*) 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias. Os animais foram sacrificados, sob anestesia, 11 dias após a indução da periodontite. Amostras de tecido gengival foram removidas da região dos molares superiores esquerdos e processadas para dosagem dos níveis de PGE2 (figura 9A) e de IL-1 $\beta$  (figura 9B) por ELISA. *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg) reduziu os níveis de PGE2 e de IL-1 $\beta$ , quando comparados ao grupo não tratado. \* $p < 0,05$  versus naive; \*\* $p < 0,05$  versus não tratado (NT). (ANOVA, Bonferroni)



**Figura 9:** Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg) sobre a análise imunohistoquímica para a Cicloxigenase 2 (COX-2) na maxila de animais submetidos à indução da periodontite. A Periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) na cervical dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) ou salina foram administradas 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias após a indução da periodontite. Os animais foram eutanasiados, sob anestesia, 11 dias após a indução da periodontite. **A.** Controle negativo da reação; **B.** Maxila de animal que foi submetido à periodontite e que recebeu apenas o veículo (grupo não tratado), mostrando intensa marcação para COX-2; **C.** Maxila de animal submetido à periodontite e tratado com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg), mostrando redução da marcação para COX-2. Aumento 400x. A seta branca indica fibroblastos marcados para COX-2.



**Figura 10:** Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratas submetidas à indução da periodontite. A Periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) na cervical dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) ou salina foram administradas 30 minutos antes da cirurgia, sendo eutanasiadas 6 horas após a mesma. Nos animais do grupo não tratado (salina), observou-se um significativo aumento na atividade de MPO, enquanto que no grupo *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg), este parâmetro diminuiu. As barras representam média±EPM de unidades de MPO/mg de tecido. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo naïve. \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo não tratado (NT). (ANOVA, Bonferroni).

## 6.8. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETOS SISTÊMICOS

### 6.8.1. Análise da variação da Curva Ponderal

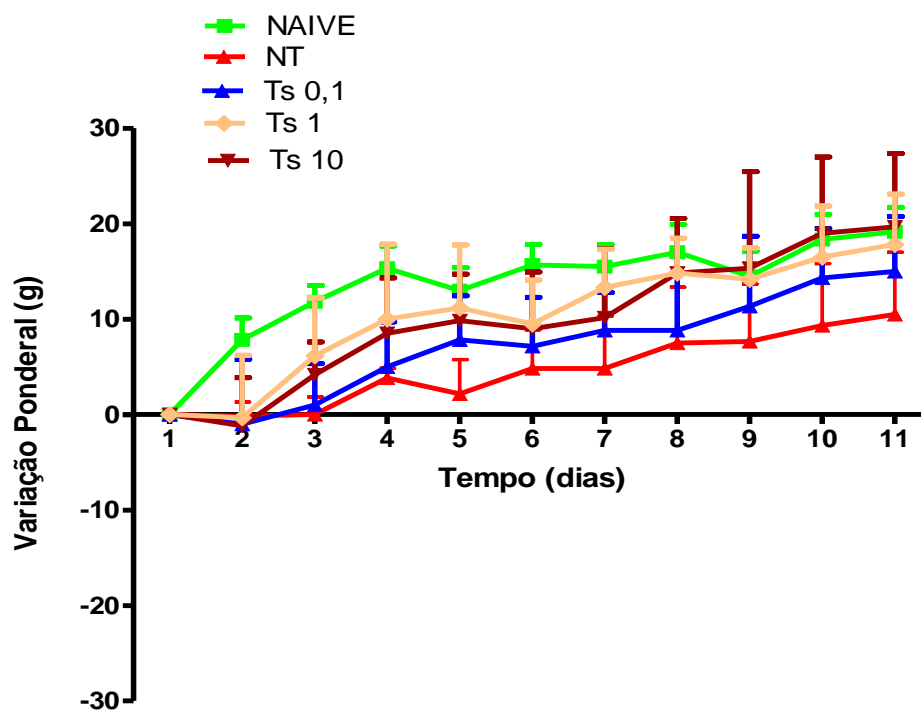
Analisando-se a variação de massa corpórea, observou-se que nos 2 primeiros dias do experimento todos os grupos de animais apresentam discreta perda ponderal ou mantêm o peso do dia zero (dia antes da indução da periodontite). Entretanto, a partir do 3º dia de experimento, todos os grupos tratados com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1; ou 10 mg/kg) apresentam tendência de ganho de peso, quando comparado com os animais não tratados que, embora também apresentem uma curva de peso ascendente, essa encontra-se sempre abaixo dos valores observados nos animais tratados com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1; ou 10 mg/kg) (**Figura 11**).

### 6.8.2. Parâmetros bioquímicos: dosagem de Fosfatase Alcalina, Creatinina, AST e ALT e massa úmida dos órgãos

O tratamento (*per os*) dos animais com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não afetou adversamente ( $p < 0,05$ ) os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (FAT), creatinina e enzimas hepáticas (AST e ALT) (**Tabela 3**), nem tampouco a massa úmida dos órgãos (**Tabela 4**), quando comparado aos animais não tratados.

### 6.8.3. Análise histopatológica dos órgãos (coração, fígado e rim)

A análise histopatológica dos órgãos (coração, fígado e rim) dos animais revelou que não houve diferença entre os animais tratados com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) e aqueles do grupo não tratado (**Figura 12**). Entretanto, ao exame microscópico foi observado presença de leve tumefação no parênquima hepático em um animal do grupo não tratado (salina) e presença de discreto infiltrado inflamatório focal em um animal do grupo *Ts* 10 mg/kg.



**Figura 11: Efeito do tratamento com *Tocoyena sellowiana* sobre a curva ponderal de ratas.** A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. Os animais foram pesados diariamente, observando-se a variação (%) em relação ao peso antes da indução da periodontite (dia zero). O grupo naive representa animais não submetidos à indução da periodontite. O grupo NT representa animais submetidos à indução da periodontite e tratados apenas com o veículo (salina). Os dados representam à média±EPM da variação ponderal (%). N = 7 para cada intervalo de tempo. (ANOVA, Bonferroni).

**Tabela 3: Avaliação de parâmetros bioquímicos de ratas submetidas à indução de periodontite experimental e tratadas (*per os*) com *Tocoyena sellowiana*.**

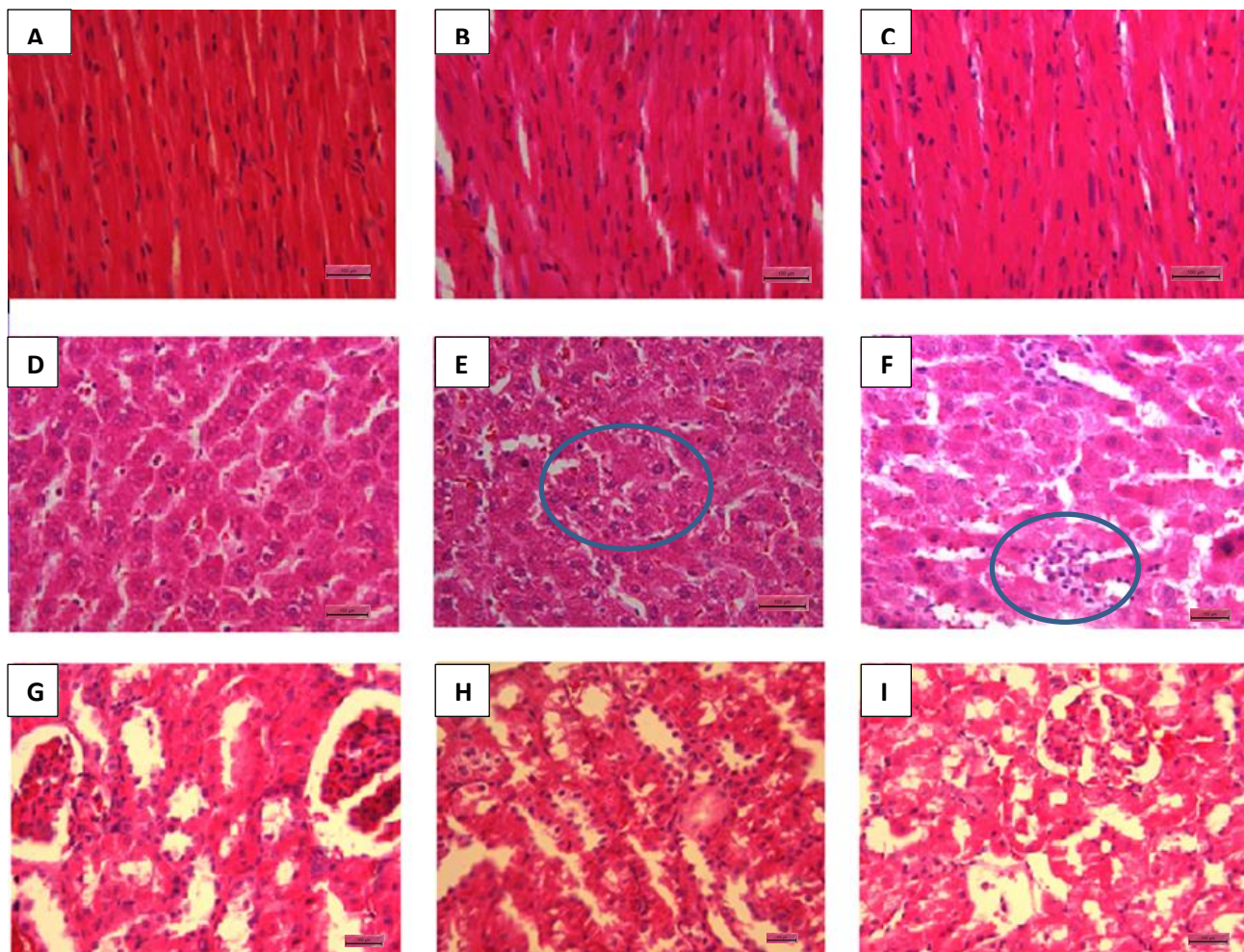
Parâmetro	Naive	NT	<i>Tocoyena sellowiana</i> (0,1mg/kg)	<i>Tocoyena sellowiana</i> (1mg/kg)	<i>Tocoyena sellowiana</i> (10mg/kg)
<b>Fosfatase Alcalina</b>	98,31 ± 1,98	110,2 ± 9,00	92,31 ± 3,20	105,4 ± 6,10	97,3 ± 8,19
<b>Creatinina</b>	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,55 ± 0,02
<b>AST</b>	102,9 ± 8,27	88,3 ± 4,08	81,69 ± 6,32	88,69 ± 4,49	98,80 ± 5,25
<b>ALT</b>	54,10 ± 2,01	47,63 ± 1,36	42,41 ± 1,69	47,67 ± 0,45	55,24 ± 4,43

Os valores representam média ± E.P.M. (p>0,05) (ANOVA, Bonferroni)

**Tabela 4: Avaliação do peso úmido (g) de órgãos (fígado, rins e coração) de ratas submetidos à indução da periodontite e tratados com *Tocoyena sellowiana* (Ts) (10 mg/kg).**

Peso úmido (g)	Tratamentos (v.o.)		
	Naive	NT (salina)	Ts (10 mg/kg)
<b>Fígado</b>	9,90 ± 0,35	9,92 ± 0,37	10,81 ± 0,28
<b>Rins</b>	1,82 ± 0,04	1,84 ± 0,05	1,99 ± 0,05
<b>Coração</b>	0,88 ± 0,03	0,87 ± 0,04	0,92 ± 0,10

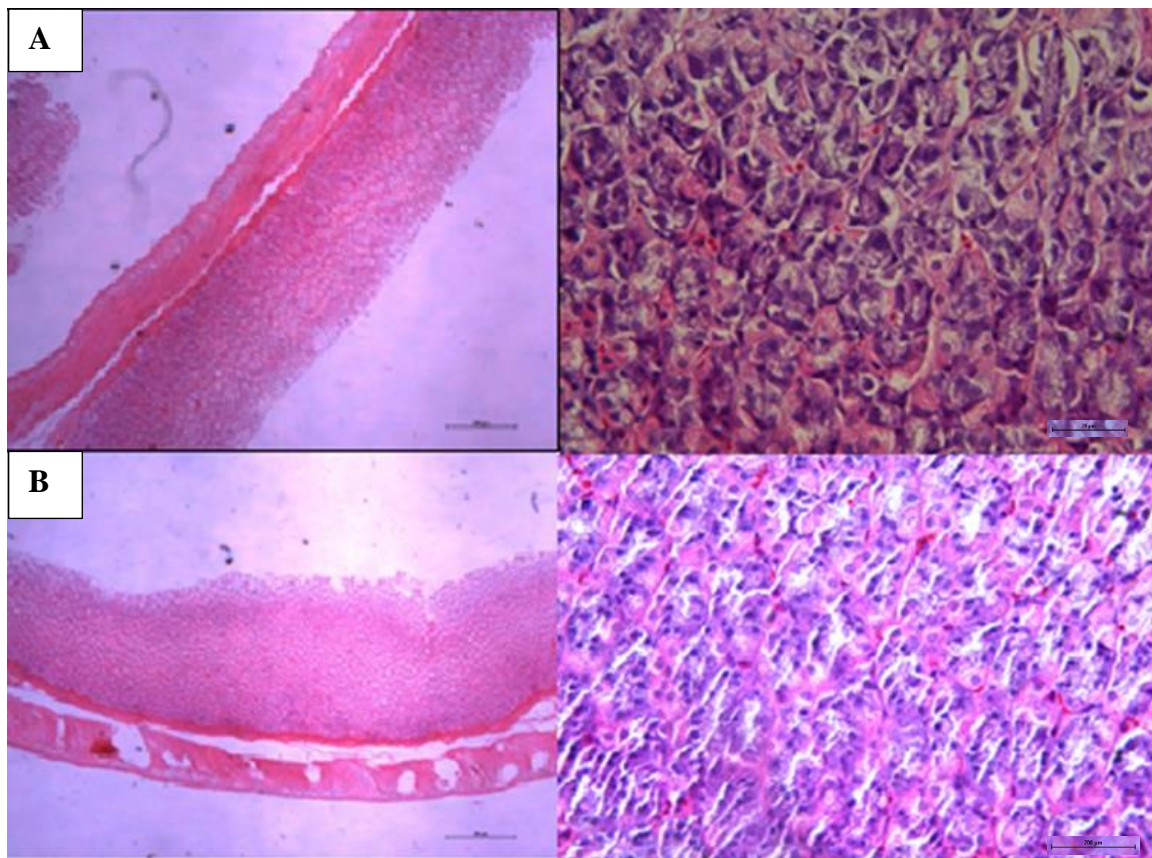
Os valores representam média ± E.P.M. (p>0,05) (ANOVA, Bonferroni)



**Figura 12: Fotomicrografias de órgãos de ratas tratados com *Tocoyena sellowiana* (*Ts*) e submetidas à indução da periodontite.** Após 11 dias de tratamento com *Ts* (10 mg/kg), os animais foram eutanasiados, sob anestesia, e os órgãos removidos e processados para rotina por H&E. Coração (A, B, C), fígado (D, E, F) e rim (G, H, I) **A, D, G:** Grupo naive. **B, E, H:** Grupo não tratado. **C, F, I:** Grupo *Ts* 10mg/kg (400x). Em destaque área de tumefação em **E** grupo não tratado, **F** discreto infiltrado inflamatório no parênquima hepático do animal pertencente ao grupo *Ts* 10mg/kg. O restante sem alterações dignas de nota.

#### 6.8.4. Análise histopatológica da mucosa gástrica

A análise histopatológica dos estômagos dos animais revelou que não houve diferença entre os animais tratados com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) e aqueles que receberam apenas o veículo (grupo não tratado) (**Figura 13 e Tabela 5**).



**Figura 13: Fotomicrografias da mucosa gástrica de animais tratados com *Tocoyena sellowiana* e submetidas à indução da periodontite.** Após 11 dias de tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg), os animais foram eutanasiados, sob anestesia, e os estômagos removidos e processados para rotina por H&E. **A.** Grupo não tratado (100x e 400x); **B.** Grupo tratado com *Tocoyena sellowiana* (10mg/kg) mostrando a integridade da mucosa gástrica (100 e 400x).



**Tabela 5: Análise histopatológica do efeito de *Tocoyena sellowiana* (Ts) sobre a mucosa gástrica de ratas submetidas à periodontite.**

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Perda de células epiteliais</b>	<b>Edema</b>	<b>Lesão hemorrágica</b>	<b>Infiltrado celular</b>
<b>Naive</b>	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)
<b>Não Tratado</b>	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
<b>Ts (0,1mg/kg)</b>	0(0-0)	0 (0-1)	0(0-0)	0(0-0)
<b>Ts (1mg/kg)</b>	0 (0-1)	0 (0-2)	0(0-0)	0(0-0)
<b>Ts (10mg/kg)</b>	0 (0-2)	1 (0-2)	0(0-0)	0(0-0)

Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. ( $p>0,05$ ) (ANOVA, Bonferroni)

## 7. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença de caráter imuno-inflamatório crônico que compromete sobremaneira a funcionalidade do sistema estomatognático dos pacientes acometidos. Infelizmente, a terapêutica atual desse processo nosológico, representada principalmente por anti-inflamatórios não-esteroidais, remoção mecânica de placa bacteriana e cálculo, atua apenas como lenitivo, sem afetar seu curso evolutivo. Neste sentido, hodiernamente, existe uma busca crescente por novas drogas anti-inflamatórias, o que pode ser motivada principalmente por distorções na efetividade do arsenal atualmente empregado (YUNES; CALIXTO, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003). E dentro desse cenário, os fármacos obtidos a partir de fontes naturais vem ganhando a cada dia mais espaço.

Vários modelos animais de inflamação podem ser utilizados para investigar a atividade anti-inflamatória de extratos e compostos. Cada um possui características próprias que devem ser consideradas, tais como sofrimento mínimo à espécie utilizada, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e, principalmente, a possibilidade de correlação desses resultados com estudos clínicos (PIETROVSKI, 2004).

No presente estudo, buscou-se demonstrar o possível efeito protetor da *Tocoyena sellowiana* na perda óssea em modelo de periodontite em ratas, bem como elucidar o mecanismo pelo qual essa planta atua. Para tal, a periodontite foi induzida através da colocação cirúrgica de um fio de náilon (3-0) na cervical do segundo molar superior esquerdo de ratas Wistar de acordo com o modelo desenvolvido por vários autores (CRAWFORD *et al.*, 1978; SALLAY *et al.*, 1982; SAMEJIMA *et al.*, 1990; KOIDE *et al.*, 1995) e modificado pelo nosso grupo (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; ALENCAR *et al.*, 2002; LEITÃO *et al.*, 2005). 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 bacteriano e hospedeiro, induzindo a perda óssea alveolar (LIMA *et al.*, 2000).

A estrutura e a organização do tecido periodontal da região de molares em ratos, incluindo epitélio gengival oral, epitélio sulcular oral, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento e osso alveolar, são muito semelhantes àquelas do homem. Dessa forma, o modelo aqui utilizado foi capaz de reproduzir as principais características encontradas na periodontite em humanos, sendo pertinente para o estudo dessa doença (BEZERRA *et al.*, 2002).

No presente estudo, à semelhança de anteriores (MENEZES *et al.*, 2005; MENEZES, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013), observou-se uma significativa perda óssea alveolar em ratas no 11º dia após a indução de periodontite. Essa perda óssea foi reduzida de forma significativa pelo tratamento (*per os*) com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10mg/kg). Podemos observar que esta redução se deu de forma dose-dependente, encontrando melhor inibição da atividade reabsortiva na dose de 10 mg/kg.

Para nosso conhecimento esse é o primeiro relato na literatura da atividade anti-reabsortiva da *Tocoyena sellowiana*. Esse efeito pode estar relacionado com a propriedade anti-inflamatória do ácido quinóico, de flavonoides presente no extrato de *Tocoyena sellowiana*, conforme demonstrado no estudo de Baba e colaboradores (1992).

A Fosfatase Alcalina (FAT) é uma metaloenzima presente na membrana celular, é distribuído no fígado, intestino, placenta e osso (MENEZES, 2010). A Fosfatase Alcalina específica do osso (FAO) é uma isoenzima da fosfatase alcalina. Considerada um marcador da atividade osteoblástica, a FAO está envolvida em processos de formação óssea, e é a principal enzima envolvida na remoção de pirofosfato inorgânico, um inibidor da mineralização óssea (GOES *et al.*, 2012).

Os dados obtidos no nosso trabalho em relação à perda alveolar óssea foram confirmados através da dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO), a qual é um marcador da atividade osteoblástica. Gilbert e colaboradores. (2003) mostraram que a dosagem de FAO no soro de pacientes com periodontite foi menor quando comparados com pacientes saudáveis. No nosso trabalho não tivemos diminuição da FAO nos animais com periodontite não tratados, porém estes níveis ficaram semelhantes aos dos animais naive. A dosagem de FAO pode ser utilizada como um marcador da atividade da doença ou como parâmetro de resposta ao tratamento instituído (SARAIVA; LAZRETTI-CASTRO, 2002). Observamos que *Tocoyena sellowiana* induziu um aumento de produção desta enzima no 11º dia de tratamento, corroborando com a diminuição de perda óssea nesta dose ou, até mesmo, com a promoção de nova formação óssea. De acordo com Keles *et al.* (2005), altos níveis séricos de FAO na periodontite estão associados com aumento da formação óssea.

A análise histopatológica (H&E) das hemiarcadas do grupo não tratado, ou seja, o grupo submetido à indução da periodontite e que recebeu apenas veículo (salina), mostrou a presença de intenso infiltrado celular inflamatório, destruição do processo alveolar e do cemento, achados que se correlacionam com os estudos de Lima e

colaboradores (2000), de Leitão e colaboradores (2004), Menezes e colaboradores (2005), Menezes (2012), Oliveira (2013). Os animais tratados com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) apresentaram significativa redução do número de osteoclastos, preservação do processo alveolar e cemento, e uma redução do infiltrado celular inflamatório, quando comparados aos animais do grupo não tratado.

No presente estudo observou-se que o extrato etanólico de *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival de ratas. Nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, a célula predominante e primeiramente recrutada para o foco inflamatório é o neutrófilo (KUBES, 1993; ROSSI; HELLEWELL; 1994), sendo a mieloperoxidase a enzima considerada marcadora de neutrófilos em processos inflamatórios agudo (KLEBANOFF *et al.*, 1999; WINTERBOURN; VISSERS; KETLE, 2000; GASSER *et al.*, 2003), embora essa enzima possa ser encontrada em outras células como macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 2011). Podemos supor que ocorreu inibição da migração de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares, e que teve um impacto positivo na reabsorção óssea, assim como os estudos de Rodrigues e colaboradores (2011).

Durante o processo inflamatório que caracteriza a periodontite, esse influxo celular atua sobremaneira para a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGs, o que contribui para a amplificação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, do dano tissular que caracteriza a periodontite (ARAÚJO *et al.*, 2013; KATS *et al.*, 2013).

A formação das prostaglandinas (PG) está sob o controle das isoenzimas ciclo-oxigenases. As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico que é liberado das membranas celulares por fosfolipases e, posteriormente, convertido em prostaglandinas no sítio catalítico das COX (KATS *et al.*, 2013). As principais alterações inflamatórias observadas na periodontite como eritema gengival, edema e reabsorção óssea, são mediadas por ações diretas das PG, particularmente aquelas da série E (PGE-2) (CHOI *et al.*, 2005). Ainda, as PG estão envolvidas no recrutamento de osteoclastos estimulados por IL-1, podendo afetar as células progenitoras dos mesmos, além de promover sua diferenciação (WANG *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores sugerem que o principal efeito de PGE-2 sobre a reabsorção é através da regulação positiva do receptor ativador do NF- $\kappa$ B, expressão do ligante RANKL e pela inibição da expressão da osteoprotegerina (OPG) em células osteoblásticas (BLACKWELL *et al.*, 2010).

Sabe-se que a enzima COX pode apresentar-se sob duas isoformas distintas, a saber: COX-1 e COX-2. A COX-1, isoforma constitutiva, induz a produção de PGs envolvidas na regulação de funções fisiológicas, enquanto que a COX-2, isoforma induzida, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos sendo, portanto, responsável pela formação das PGs associadas com a resposta inflamatória (VANE *et al.*, 1976). Estas linhas de evidência sugerem que a inibição da COX-2 seria responsável pelos efeitos terapêuticos dos agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), enquanto a inibição da COX-1 seria responsável pela toxicidade desses agentes (VANE; BOTTING, 1996).

Especificamente com relação ao processo inflamatório que caracteriza a periodontite, uma alta expressão da COX-2 foi demonstrada em células inflamatórias mononucleares, células endoteliais e células epiteliais oriundas de tecido gengival (HOLZHAUSEN *et al.*, 2009). Neste sentido, Bezerra e colaboradores (2000), demonstraram que o meloxicam, um inibidor preferencial da COX-2, preveniu a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite em ratos. De forma semelhante, Holzhausen e colaboradores (2009), demonstraram que celecoxib, um inibidor específico da COX-2, preveniu a perda óssea alveolar nesse mesmo modelo animal. Ainda, Morton e Dongari-Bagtzoglou (2001), demonstraram que em tecidos gengivais inflamados existe uma alta expressão da enzima COX-2 e que a síntese “*in vitro*” de PGE2 por fibroblastos gengivais pode ser bloqueada pelo NS-398 [N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)]-methanesulfonamide, um agente que inibe seletivamente a atividade da COX-2. Além de fármacos sintéticos, alguns autores demonstraram que os flavonoides nobiletin e tangeretin, presentes em abundância na casca de laranja, suprimem a expressão de COX-2 e a produção de PGE2 em osteoblastos, além de suprimir a ativação de IL-1 $\beta$  induzida pela transcrição dependente de NF-kB (TOMINARI *et al.*, 2012).

Diante dessas evidências, avaliamos os níveis de PGE2 no tecido gengival dos animais submetidos à indução da periodontite e tratados com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg). Em concordância com dados da literatura (LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; KATS *et al.*, 2013), demonstramos níveis aumentados de PGE2 no tecido gengival aos 11 dias de periodontite. Ainda, o tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) reduziu de forma significativa os níveis de PGE2 nos tecidos gengivais. Neste sentido, alguns autores demonstraram que a concentração de PGE2 no fluido gengival pode ser utilizada como um marcador da periodontite tendo em vista os níveis elevados

desse mediador lipídico nas formas graves de periodontite (ZHU-LING *et al.*, 2013; KATS *et al.*, 2013). Ratificando esses achados, a análise imunohistoquímica para COX-2 revelou que os animais do grupo não tratado (salina) apresentaram grande quantidade de fibroblastos imunomarcados para COX-2, enquanto que nos animais que receberam a *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) houve uma acentuada redução da imunomarcagem para COX-2. Sugerimos que a capacidade do extrato de inibir perda óssea da periodontite se deve pelo menos em parte, à inibição de PGE2. O mecanismo pelo qual a *Ts* 10 mg/kg atua na inibição da COX-2 e foi eficaz em diminuir a inflamação e reabsorção óssea não está completamente esclarecido. O fato de *Ts* reduzir níveis de PGE2 pode ser um mecanismo pelo qual o extrato de *Ts* retardaria a degradação de osso alveolar. A inibição de mediadores inflamatórios, tais como PGs, IL-1 $\beta$ , também foi um mecanismo anti-inflamatório importante nos estudos realizados por Tominari e colaboradores (2012), visto que esses mediadores atuam diretamente no processo de reabsorção óssea. As PGs amplificam a resposta inflamatória e estimulam a produção de quimiocinas e enzimas líticas (RODRIGUES *et al.*, 2011), além de contribuir para reabsorção óssea via regulação positiva da expressão de RANKL e inibição de OPG em pré-osteoclasto (GOES *et al.*, 2011).

No presente estudo, com a finalidade de avaliar o envolvimento da IL-1 $\beta$  no modelo de periodontite em ratas, foi realizada dosagem por ELISA em tecido gengival. A análise dos resultados revelou aos 11 dias de periodontite níveis aumentados dessa citocina nos tecidos gengivais, o que está de acordo com a literatura corrente (BOSCH *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2013; ZHU-LING *et al.*, 2013). Portanto, os resultados do presente estudo sugerem o envolvimento da IL-1 $\beta$  no modelo de periodontite em ratas. Neste sentido, alguns autores identificaram níveis aumentados de IL-1 $\beta$  no fluido gengival de pacientes com periodontite, demonstrando ainda que essa citocina estimula formação de colagenase e PGs, mediando a destruição do osso alveolar (JAVED, AL-ASKAR, AL-HEZAIMI, 2012). O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  nos tecidos gengivais. Molon e colaboradores (2013) demonstraram que IL-1 $\beta$  induz a expressão de fatores de diferenciação/ativação de osteoclastos, o que resulta na degradação do tecido conjuntivo e reabsorção óssea. Além disso, IL-1 $\beta$  pode induzir a regulação de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais e estimular a produção de quimiocinas necessárias para recrutar leucócitos circulantes. Essa citocina pode induzir a expressão de novos mediadores, incluindo as PG, contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória.

Portanto, nossos resultados sugerem que a eficácia anti-reabsortiva de *Tocoyena sellowiana* no modelo de periodontite em ratas parece envolver, pelo menos em parte, a inibição dos níveis de PGE-2 e de IL-1 $\beta$ .

Uma vez demonstrada o provável mecanismo de ação de *Tocoyena sellowiana* no modelo de periodontite em ratas, buscou-se avaliar a sua segurança.

A avaliação de testes de enzimas hepáticas podem ser divididos naqueles que refletem lesão hepatocelular e naqueles que refletem aumento na produção enzimática consequente à colestase ou indução por drogas (LIMA *et al.*, 2004; DUNCAN *et al.*, 2003).

O citoplasma do hepatócito é rico em ALT, e um insulto (toxina, hipóxia) à membrana hepatocelular resulta num aumento da ALT sérica. De forma aguda (horas ou dias), a magnitude do aumento torna-se mais ou menos paralela ao número de hepatócitos com a permeabilidade de membrana alterada (DANTAS *et al.*, 2006). As mais altas concentrações de AST estão localizadas principalmente nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos. Baseado nos estudos em humanos, cerca de 60 a 80% do AST do interior de hepatócitos está associado às mitocôndrias e o restante em forma solúvel no citossol (KANEKO *et al.*, 1997).

A fosfatase alcalina total (FAT) é uma enzima membrana-associada, localizada em vários tecidos, mas somente dois são importantes para o diagnóstico: tecido ósseo e hepatobiliar (RODRIGUES *et al.*, 2006). Com exceção dos animais em crescimento, ou pacientes com doença óssea, a elevada atividade sérica da FAT tem origem hepática. O fluxo biliar prejudicado (colestase) resulta numa elevada produção de FAT em todas as espécies. O aumento na atividade sérica de FAT ocorre antes do desenvolvimento da hiperbilirrubinemia (MEYER, 1998).

No presente estudo a determinação dos níveis das enzimas hepáticas ALT, AST, FAT dos animais tratados com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) durante os 11 dias de tratamento não foram diferentes daqueles observados com o grupo que recebeu apenas salina, sugerindo que o uso *Tocoyena sellowiana* não promoveu dano hepático. Para maior segurança de nosso resultado, foi realizada análise macroscópica e microscópica do tecido hepático, onde não foi encontrada hepatomegalia. Entretanto, foi observado presença de leve tumefação em alguns animais do grupo não tratado (salina) e presença de discreto infiltrado inflamatório focal em um animal do grupo *Ts* 10 mg/kg. No entanto, essas alterações são reversíveis, ratificando os resultados encontrados nas dosagens de bioquímicas séricas.

A creatinina, usada para avaliação da função renal, é formada através do metabolismo da creatina e fosfocreatina muscular. O nível sanguíneo não é afetado pela dieta, idade e sexo (SANTOS *et al.*, 2010). A creatinina é totalmente excretada pelos glomérulos renais, não havendo a reabsorção tubular. A creatinina pode estar elevada no soro devido a fatores pré-renais como diminuição do fluxo sanguíneo; fatores renais como a diminuição da filtração glomerular; e fatores pós-renais como a ruptura e/ou obstrução do trato urinário (MEYER *et al.*, 1998; DANTAS *et al.*, 2006). O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não afetou os níveis séricos de creatinina, sugerindo a ausência de lesão renal. Esse resultado foi confirmado pela análise macroscópica e microscópica do tecido renal, onde não foi encontrada nenhuma lesão renal glomerular e tubular.

O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não afetou o tecido cardíaco. Esse resultado foi confirmado pela análise macroscópica e microscópica do coração. A análise histopatológica do coração não revelou danos à musculatura cardíaca.

Ainda, considerando-se os parâmetros de segurança, analisamos a integridade da mucosa gástrica dos animais após os 11 dias de tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1; 10 mg/kg). A avaliação dos parâmetros macroscópicos e microscópicos da mucosa gástrica dos animais que utilizaram a *Tocoyena sellowiana* mostrou ausência de edema, hemorragia, células inflamatórias ou perda de células epiteliais.

Em relação a variação de massa corpórea, observou-se que nos 2 primeiros dias do experimento todos os grupos de animais apresentam discreta perda ponderal, entretanto, a partir do 3<sup>o</sup> dia de experimento, todos os grupos tratados com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1; ou 10 mg/kg) apresentam tendência de ganho de peso, quando comparado com os animais não tratados, este parâmetro reflete também a ausência de alteração na massa úmida dos órgãos.

Portanto, o conjunto das análises bioquímicas, macro e microscópicas confirmam que o tratamento com *Tocoyena sellowiana* é seguro quando administrado (*per os*) em ratas por um período de 11 dias.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) reduz a perda óssea alveolar no modelo de periodontite em ratas através da redução dos níveis de PGE-2, IL-1 $\beta$  e MPO nos tecidos periodontais e aumento de FAO sérica;
  
- ✓ A administração de *Tocoyena sellowiana* (10 mg/kg) durante 11 dias não afetou parâmetros bioquímicos, curva ponderal, peso úmido e análise microscópica dos órgãos, sugerindo que *Ts* pode representar uma opção terapêutica segura no modelo de periodontite em ratas.

## 9. CONCLUSÃO

- ✓ **O extrato etanólico de *Tocoyena sellowiana* é eficaz e seguro em ensaio pré-clínico de periodontite.**

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L M. G., LOPES, F. F., PEREIRA, A. F. V., PEREIRA, A. L. A., Alves, C. M. C. Doença periodontal e condições sistêmicas: mecanismos de interação. **Rev Pesq Saúde**, v.11, n.2, p. 52-56, 2010.
- ADAMS, J.L., BADGER, A.M., KUMAR, S., LEE, J.C. P38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. **Prog Med Chem**. v.38:1, p.60, 2001.
- ALENCAR, V. B.; BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ABREU, A. L.; BRITO, G. A.; ROCHA, F. A.; RIBEIRO, R. A. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**. v. 73, n. 3, p. 251-6, 2002.
- AMADEI, S. U.; SOUZA, D. M.; BRANDÃO, A. A. H.; ROCHA, R. F. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats, **Braz. oral res**. v.25, n.6, 2011.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Rev Odontol UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.
- AQUINO, R.; SIMONE, F.; PIZZA, C. Plant metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **J. Nat. Prod**. v. 52, p. 679, 1989.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da Doença Periodontal na América Latina. **R. Periodontia**, v. 17, 2007.
- ARAÚJO, A. A.; SOUZA, G. L.; SOUZA, T.O.; BRITO, G. A. C; ARAGÃO, K. S.; MEDEIROS, C. A. X.; LOURENÇO, Y.; ALVES, M.S.C.F.; ARAÚJO JR, R. F. Olmesartan decreases IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. 2013
- BABA, S.; AKRELE, O; KAWAGUCHI, Y. Natural Resources and Human Health – Plants of medicinal and nutritional **Value**. p. 133, 1992.
- BARBATO, P. R.; NAGANO, H. C. M.; ZANCHET, F. N.; BOING, A. F.; PERES, M. A. Perdas dentárias e fatores sociais, demográficos e de serviços associados em adultos brasileiros: uma análise dos dados do Estudo Epidemiológico Nacional (Projeto SB Brasil 2002-2003). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 8, p.1803-1814, 2007.
- BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **J Clin Periodontol**. v.39, p. 239–248, 2012.

BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 35, n. 5, p. 613-6, 2002.

BEZERRA, M. M., LIMA, V., ALENCAR, V. B. M., VIEIRA, I. B., BRITO, G. A. C., RIBEIRO, R. A., ROCHA, F. A. C. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.** v. 71; p.1009-14, 2000.

BIESKI, I. G. C. **Marketing das Plantas Mediciniais na Saúde Pública** .Disponível em: <[//www.esalq.usp.br/siesalq/pm/marketing.pdf](http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/marketing.pdf)>. Acesso em: 23 set. 2011.

BLACKWELL, A. K.; RAISZ, G. L.; PILBEAM, C. C. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? **Trends in Endocrinology & Metabolism.** v. 21, n. 5, p. 294-301, 2010.

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

Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010: **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal.** Brasília, DF, 2011.

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

BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Res Devel Phytochem,** v.5, p. 19-31, 2001.

BOLZANI, V.D.S., TREVISAN, L.M.V., IZUMISAWA, C.M., YOUNG, M.C.M. Antifungal iridoids from the stems of *Tocoyena formosa*. **J Braz Chem Soc** , v.7, p. 157-160, 1996.

BOLZANI, V.D.S., IZUMISAWA, C.M., YOUNG, M.C.M., TREVISAN, L.M.V., KINGSTON, D.G.I., GUNATILAKA, A.L. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry,** v. 46, p. 305-308, 1997.

BORGES JR, I.; MOREIRA, E.A.M.; WILHEM FILHO, D.; OLIVEIRA, T.B.; SILVA, M.B.S.; FRODE, T.S. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. **Mediators Inflamm.,** v.20, p.1-5, 2007.

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

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature,** v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J., SANTOS, A. R., FILHO, V. C., YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 401-18, 2000.

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, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B., BEIRITH, A., FERREIRA, J., SANTOS, A.R., FILHO, V.C., YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res.* v.14, p.401-18, 2000.

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

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, S. N. S. M. S. A.Q; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 11, p. 26-32, 2007.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.T.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**. October 15; 99(21): 13926–13931, 2002.

CHOI, B. K.; MOON, S. Y.; CHA, J. H.; KIM, K. W.; YOO, Y. J. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. **J Periodontol**. v. 76, n. 5, p. 813-20, 2005.

COELHO, V.P.M., AGRA, M.F., BARBOSA, M.R.V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

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

CONSOLARO, H. N. A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma cerrado. Tese de Pós-Graduação. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ecologia. Brasília-DF, 2008.

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

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**. v. 10, p. 742-780, 1997.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do

Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Revista Acta Sci Health Sci.** v. 28, n. 2, p.165-170, 2006.

DE MOLON, R.S., DE AVILA, E.D., CIRELLI, J.A. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. **J Investig Clin Den.** doi:10.1111/jicd.12018t, 2012.

DELPRETE, P. Rubiaceae. *In*: SMITH, N. P. et al. (Ed.). Flowering plant families of the American tropics, **Princeton University Press New York Botanical Garden Press**, USA, p. 328-333, 2004.

DELPRETE, P.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiáceas. *In*: REITZ, R.; REIS, A. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: HBR/TBG/SIDB. 2 v. 2004/2005.

DEO, V., BHONGADE, M.L. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. **Dent Today** v. 29, n. 9, p.60–62, 64–66; quiz 68–69, 2010.

DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W., MAHAFFEY, E. **Veterinary Laboratory Medicine**. 4th ed. Iowa: Ames, p. 450, 2003.

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

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 13, p. 81-83, 2003.

FIEHN, N.E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R.T. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. **J. Periodont Res.** v. 27, n. 6, p. 609-14, nov. 1992.

FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). **Nature**, v. 240, p.410-411, 1972.

GAPSKI, R., BARR, J.L., SARMENT, D.P., LAYHER, M.G., SOCRANSKY, S.S., GIANNOBILE, W.V. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. **J Periodontol**, v. 75, n. 3, p. 441–452, 2004.

GARANT, P. R.; CHO, M. I. Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. I. Histometric and histologic study. **J Periodontal Res.** v.14, n.4, p. 297-309, july 1979.

GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A.. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. **Experimental Cell Research**, v. 285, p. 243-257, 2003.

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

GRAVES, D.T., LI, J., COCHRAN, D.L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **J Dent Res**, v. 90, n. 2, p. 143–153, 2011.

GAZDA, V. L. Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae). Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

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

GRENIER, D., PLAMONDON, P., SORSA, T., LEE, H.M., MCNAMARA, T., RAMAMURTHY, N.S, GOLUB, L.M., TERONEN, O., MAYRAND, D. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. **J Periodontol**, v. 73, n. 1, p.79–85, 2002.

GOES, P.; MELO, I.M., DUTRA, C.S., LIMA, A.P.S., LIMA, V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Archives of Oral Biology** ,v. 57, p. 1537-1544, 2012.

GOES, P., LIMA, V. Efeito dos bisfosfonatos na doença periodontal: revisão narrativa da literature. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara. v. 40, n. 5, p. 255-263, 2011.

GOLUB, L. M.; RYAN, M. E.; WILLIAMS, R.C. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. **Dent Today**. v.17, n. 10, p. 102-6, 1998.

HAMERSKI, L., CARBONEZI, C. A., CAVALHEIRO, A. J. e BOLZANI, V. S., YOUNG, M. C. M. SAPONINAS TRITERPÊNICAS DE *Tocoyena brasiliensis* MART. (RUBIACEAE). **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

HERNÁNDEZ, M.; DUTZAN, N.; GARCÍA-SESNICH, J.; ABUSLEME, L.; DEZEREGA, A.; SILVA, N.; GONZÁLEZ, F. E.; VERNAL, F. E. R., SORSA, T.; GAMON, J. Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis, **J Dent Res** v. 90, n. 10, p.1164-1170, 2011.

HOLZHAUSEN, M., MARCANTONIO, J.R., SPOLIDORIO, D.M.P., SPOLIDORIO, L.C. Efeito do celecoxib sobre a resposta inflamatória em doença periodontal. **R. Periodontia**, v. 19, n. 02, p. 1-7, 2009.

JAVED, F.; AL-ASKAR, M.; AL-HEZAIMI, K. Cytokine Profile in the Gingival Crevicular Fluid of Periodontitis Patients with and without Type 2 Diabetes: A Literature Review. **J Periodontol** , p. 156-161, 2012.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E. A., Stevens PF, Donoghue MJ 2008. **Plant systematics**. Sunderland: Sinauer

KANEKO, J.J., HARVEY, D.W., BRUSS, W.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, p. 932, 1997.

KARIMBUX, N.Y.; SARAIYA, V.M.; ELANGOVA, S.; ALLAREDDY, V.; KINNUNEN, T.; KORNMANN, K.S.; DUFF, G.W. Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Chronic Periodontitis in Adult Whites: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Periodontol**, v.83, p.1407-1419, 2012.

KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D. P.; SIMPORE, J. Sub-Saharan Rubiaceae: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Pak. J. Biol. Sci.** v. 14, p. 149, 2011.

KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. *In*: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. Cirurgia para implantes. São Paulo: **Artes Médicas**; p. 437-45, 2002.

KATS, A., BAGE, T., GEORGSSON, P., JÖNSSON, J., QUEZADA, H. C., GUSTAFSSON, A., JANSSON, L., LINDBERG, C., NÄSSTRÖM, K., YUCEL-LINDBERG, T. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 by aminothiazoles decreases prostaglandin E2 synthesis in vitro and ameliorates experimental periodontitis in vivo. **FASEB J.** v. 27, p. 2328–2341, 2013.

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

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

KLAUSEN, B.; Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontal.** v. 62, n. 1, p.59-73, jan. 1991.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

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

KOO, H. J., SONG, Y. S., KIM, H. J., LEE, Y.H., HONG, S.M., KIM, S.J., KIM, B.C., JIN, C., LIM, C. J., PARK, E. H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of ardenia. **Eur J Pharmacol**, v. 495, p. 201-208, 2004.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 7, p. 88-97, 1993.

LA TOUCHE R, ANGULO-DÍAZ-PARREÑO S, DE-LA-HOZ JL, FERNÁNDEZ-CARNERO J, GE HY, LINARES MT, MESA J, SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ J.



Effectiveness of acupuncture in the treatment of temporomandibular disorders of muscular origin: a systematic review of the last decade. **J Altern Complement Med.** v.16, n.1, p.107-12, 2010.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A. ;CHAVES, H. V. ; LIMA, V. ; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G.A. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology.** v. 76, n.6, p. 956-963, 2005.

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

LIMA, V.; BEZERRA, M.M.; MENEZES ALENCAR, V.B.; VIDAL, F.D.; ROCHA F.A.; CASTRO BRITO, G.A.; ALBUQUERQUE RIBEIRO, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci.** v.108, n.2, p.123-9, 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of TNF- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J Periodontol.** v. 75, n. 1, p. 156-62, 2004.

LIMA, V., BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. , Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite –papel de moduladores farmacológicos, **R Periodontia** v.18, p. 7-19, 2008.

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

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

MADDEN, T. E.; CATON, J. G. Animal models for periodontal disease. **Methods Enzymol.** v. 235, p. 106-19, 1994.

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

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

MARTINS, M. C. A.; NETA, M. C. A. F.; LANDIM, J. R.; GURGEL, H. M., NUTO, S. A. S.; BRAGA, J. U. Fatores de Risco associados à doença periodontal em uma comunidade nordestina de baixa renda. **Braz J Periodontol**, v.22, p. 47-53, 2012.

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

MEAGHER, E.A. Cardiovascular and renovascular implications of COX-2 inhibition. **Curr Pharm Des**. v. 10, n. 6, p. 603-11, 2004.

MELO, I. M.; LIMA, V. Efeitos do anastrozol na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas. 110 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, Dissertação de mestrado, 2012.

MENEZES, A. M. A.; SOUZA, G. F. P.; GOMES, A. S.; CARVALHO LEITÃO, R. F.; ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; OLIVEIRA, M. G.; CASTRO BRITO, G. A. S-Nitrosoglutathione Decreases Inflammation and Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 83, p. 514-521, 2012.

MENEZES, A. M. A. Estudo do papel do S- nitrosoglutathione na doença periodontal experimental e na inflamação aguda. 2010. 157f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, 2010.

MEYER, D.J., HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. 372 p.

MOLON, R. S.; AVILA, E.D.; NOGUEIRA, A.V.B.; SOUZA, J.A.C.; AVILA-CAMPOS, M.J.; ANDRADE, C.R.; CIRELLI, J.A. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. **Journal of Periodontology**; 2013.

MORTON, R.S.; DONGARI-BAGTZOGLU, A.I. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. **J Periodontol**; n.72, v.4, p.461-9, 2001.

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

NAVARRO, V. P.; NAVARRO, P. N.; SILVA, L. A. B., FREITAS, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**; v. 35, n.4, p. 233-38, 2006.

OLIVEIRA, J. M., Eficácia e segurança do fitomedicamento Aplause® (*Cimicifuga racemosa*) em ensaio pré-clínico de periodontite: análise do envolvimento do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2013.

OLIVEIRA, P. L. Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aubl. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia, 2009.

OSHIMA, M.; MURAI, N.; KARGMAN, S.; *et al.* Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. **Cancer Res.** v. 61, n. 4, p. 1733-40, 2001.

PAGE, R.C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology.** v.14, p. 1997, 2004.

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

PEREIRA, M. S., BARBOSA, M. R. V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.18, n.2, p. 305-318, 2004.

PRESHAW, P.M.; TAYLOR, J.J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J Clin Periodontol;** v.38, s. 11, p. 60–84, 2011.

PIETROVSKI, E. F. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart. Curitiba. Dissertação - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

PISCOYA, J. Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis*. **Inflamm. Res.**, v. 50, p.442-448, 2001

PUCHER, J.; STEWART, J. Periodontal disease and diabetes mellitus. **Curr Diab Rep.** v.4, n.1, p. 46-50, 2004.

REID, P.; HOLEN, T. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 88, n. 1, p. 1-17, 2009.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-272, 1988.

ROBINSON, M.; HART.; PIGOTT, G. H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. **Lab anim.** v. 25, n. 3, p. 247-53, july. 1991.

RENNÓ, L. R. Pequeno dicionário etimológico das famílias botânicas. Belo Horizonte: Universidade de Minas Gerais, p. 186, 1963.

RIBEIRO, S. G., CUNHA, E. V. L. Estudo químico de *Tocoyena formosa*. XII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Brasil, 2004.

RICHARDS, J. B., JOSEPH, L., SCHWARTZMAN, K., KREIGER, N., TENENHOUSE, A., GOLTZMAN, D. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone mineral density: results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. **Osteoporos Int** v. 17, n. 9, p. 1410–1419, 2006.

RODRIGUES, W.F.; MADEIRA, M.F.M.; SILVA, T.A.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; MIGUEL, C.B.; DIAS-Da-SILVA, V.J.; BARBOSA-NETO, O.; LOPES, A.H.; NAPIMOGA, M.H. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. **British Journal of Pharmacology**, v.165 p.2140–2151, 2012.

RODRIGUES, E.R.; MORETI, D.L.C.; MARTINS, C.H.G.; KASAI, A.; STOPPA, M.A.; ALVES, E.G.; PAZ, K.; LOPES, R.A.; SALA, M.A.; PETENUSCI, S.O. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. *Chiococca Alba* (L.) Hitchc]. **Rev. Bras. Pl. Méd.** v.8, n.4, p. 169-172, 2006.

ROSSI, A. G.; HELLEWELL, P. G. Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. *In*: HELLEWELL, P.G.; WILLIAMS, T.J. Immunopharmacology of neutrophils: the handbook of immunopharmacology. **Academic Press**, v. 10, p. 223, 1994.

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

ROVA, J.H.E., DELPRETE, P.G., ANDERSSON, L., ALBERT, V.A. A trnL- F cpDNA sequence study of the Condamineae- Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **Amer J Bot** v. 89, p. 145-159, 2002.

RUWANPURA, S.M.P.M., NOGUCHI, K., ISHIKAWA, I. Prostaglandin E2 Regulates Interleukin-1b-induced Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Gingival Fibroblasts. **J Dent Res.**; v.83, n.3, p.260-5, 2004.

SALLAY, K. Bacterial invasion of oral tissue of immunosuppressed rats. **Infect immun**, v. 43, n. 3, p. 1091-4, mar. 1984.

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

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

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

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

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H., MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO, A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena** v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SANTOS, R. P.; VIANA, F. A.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Spectral assignments and reference data. **Magn. Reson. Chem.**, v. 41, p. 735-738, 2003.

SANZ, M.; VAN WINKELHOFF, A. J. Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 11, p. 3–6, 2011.

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

SELVIG, K. A. Discussion: animal models in reconstructive therapy. **J Periodontol**, v. 65, n. 12, p. 1169-72, 1994.

SLOTS, J., Periodontology: past, present, perspectives. **Periodontology 2000**, v. 62, p. 7–19, 2013.

SODEK, J.; MCKEE, M. E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**. v. 4, p. 99-126, 2000.

SOMMER, C.; WHITE, F. - Cytokines, Chemokines, and Pain, *in*: BEAULIEU P, LUSSIER D, PORRECA F et al. – **Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302**, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira baseado em APG II. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p. 640, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2008.

SOUZA, R. B., Análise da Expressão do RNAm de Ciclo- Oxigenase-2 e Hemeoxigenase-1 Durante a Progressão da Periodontite em Ratos: Efeito do Ranelato de Estrôncio.2011. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011.

STRUWE, L., ALBERT, V.A., BREMER, B. Cladistics and familylevel classification of the Gentianales. **Cladistics** 10: 175-206, 1994.

TABA, J. R. M.; KINNEY, J.; KIM, A. S.; GIANNOBILE, W. V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. **Dent Clin North Am.** v. 49, n. 3, p. 551-571, 2005.

TAKAYANAGI, H., OGASAWARA, K., HIDA, S., CHIBA, T., MURATA, S., SATO, K., TAKAOKA, A., YOKOCHI, T., ODA, H., TANAKA, K., NAKAMURA, K., TANIGUCHI, T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. **Nature** 408, 600–605, 2000.

TAYLOR, C., M.; CAMPOS, M. T.V.A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v.58, n.3, p. 549-616, 2007.

TAPONDJOU, L. A. et al., Structure-activity relationship of triterpenoids isolated from *Mitragyna stipulosa* on cytotoxicity. **Arch. Pharm. Res.**, v. 25, n.3, p. 270-274, 2002.

TAT, S.K.; PELLETIER, J.P.; VELASCO, C.R.; ADRINES, M; MARTEL-PELLETIER, J. New perspectiva in osteoarthritis: the OPG and RANKL systemas a potencial therapeutic target? **Keio J. Med.** v. 58, n. 1, p. 29-40, 2009.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**; v. 289, p.1504-8, 2000.

TOMINARI, T., HIRATA, M., MATSUMOTO, C., INADA, M., MIYAURA, C.. Polymethoxy Flavonoids, Nobiletin and Tangeretin, Prevent Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Bone Loss in an Experimental Model for Periodontitis. **J Pharmacol Sci**, v. 119, p.390-394, 2012.

VANE, J. Prostaglandins as mediators of inflammation. **Adv. Prostagl. Trombox**, v. 2, p. 791, 1976.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 25, p. 9-21, 1996.

VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.38, p. 97–120, 1998.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova [online]**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VESTERGAARD, P., HERMANN, P., JENSEN, J.E, EIKEN, P., MOSEKILDE, L. Effects of paracetamol, non-steroidal anti-inflammatory drugs, acetylsalicylic acid, and opioids on bone mineral density and risk of fracture: results of the Danish Osteoporosis Prevention Study (DOPS). **Osteoporos Int**, v. 23, n. 4, p. 1255–1265, 2012.

WANG, X.; BI, Z.; CHU, W.; WAN, Y. IL-1 receptor antagonist attenuates MAP kinase/AP-1 activation and MMP1 expression in UVA-irradiated human fibroblasts induced by culture medium from UVB-irradiated human skin keratinocytes. **Int J Mol Med.** v. 16, n. 6, p. 1117-24, 2005.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETLE, A. J. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 53-58, 2000.

WOLF, H.F.; EDITH, M.; RATEITSCHAK, K.H. Introdução. *In*: WOLF, H.F.; EDITH, M.; RATEITSCHAK, K.H. **Atlas colorido de Odontologia – Periodontia**. 3<sup>o</sup> e. Porto Alegre: Artmed Editora, cap.1, p.2, 2006.

XING, L.; SCHWARZ, E. M.; BOYCE, B. F. Osteoclast precursors, RANKL/RANK and immunology. **Immunol. Rev.**, v. 208, p. 19-29, 2005.

YAMALIK, N.; ÇAGLAYAN, F.; KILINÇ, K.; KILINÇ, A.; TUER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, v.71, n.3, p.460-467, 2000.

YEN, C. A, DAMOULIS, P. D, STARK, P. C, HIBBERD, P.L., SINGH, M., PAPAS, A.S. The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 79, n. 1, p. 104–113, 2008.

YOSHIE, H.; TAUBMAN, M. A.; OLSON, C. L.; EBERSOLE, J. L.; SMITH, D. J. Periodontal bone loss and immune characteristics after adoptive transfer of Actinobacillus-sensitized T cells to rats. **Periodont Res.** v. 22, p. 499-505, 1987.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Eds.; Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna, **Ed. Argos**: Chapecó, 2001.

ZHANG, F., ENGBRETSON, S. P., MORTON, R. S., CAVANAUGH, J. R. P. F., SUBBARAMAIAH, K., DANMENBERG, A. J. the overexpression of cyclooxygenase-2 in chronic periodontitis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, p. 861-867, 2003.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin.** v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHU-LING, J., YU-QIONG, C., RUI, G., YING, L. ZHAO-CHEN, F., BIN, Z, CHENG-CHAO, G. Study of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. **Disease Markers**, v. 34, p. 295–304, 2013.