

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**LARICE KÉRCIA BRAZ MONTEIRO**

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORTIVO ÓSSEOS DA**  
***Punica granatum L.* COMBINADA OU NÃO COM LASER DE BAIXA**  
**INTENSIDADE NA PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2013**

**LARICE KÉRCIA BRAZ MONTEIRO**

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORTIVO ÓSSEOS DA  
*Punica granatum L.* COMBINADA OU NÃO COM LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE NA PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vilma Lima.

**FORTALEZA**

**2013**

*A Deus por iluminar o meu caminho e me  
dar forças para caminhar.*

*Aos meus pais Ana Alice e Ivan Júnior,  
pelo amor, apoio e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora Prof. Dra. Vilma Lima por todo empenho, sabedoria, compreensão, exigência e acima de tudo por sempre me incentivar na vida acadêmica.*

*Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) e Farmacologia (PPGF), que muito contribuíram para a minha formação acadêmica.*

*Aos professores Dra. Gerly Anne de Castro Brito e Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela pronta cessão de seus espaços laboratoriais no Departamento de Fisiologia e Farmacologia.*

*Aos professores Karina Matthes de Freitas Pontes e Maria Gonçalves Pereira, por terem aceitado participar da comissão avaliadora deste estudo.*

*Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Oral, doutorandas Iracema Matos de Melo, Aline Dantas Ana Patrícia Souza de Lima e Ana Cristina Fiallos, e às alunas de iniciação científica Vilana Araújo, Camila Carvalho, Ana Carla Santos e Luciana Cândido, pela colaboração em vários experimentos.*

*Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, pelos serviços prestados.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Projeto e Universal) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes - Projeto Pró-equipamentos), pelo suporte financeiro a este estudo.*

*Em suma, a todos que, mesmo não citados aqui, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*A Deus pela sabedoria e força em todos os momentos de minha vida. Por iluminar e guiar o meu caminho e me presentear com uma família maravilhosa.*

*Aos meus queridos pais, Ana Alice e Ivan Júnior, pelo amor e educação; aos meus irmãos Ivan Neto e Luiz Eduardo e às minhas irmãs Laura e Letícia, pelo apoio e compreensão em todos os momentos de minha vida.*

*Ao meu noivo Marcelo, pelo amor, apoio e compreensão.*

*À pós-graduanda em Odontologia Iracema Matos Melo pelo comparecimento em todas as minhas práticas experimentais, pelo apoio indispensável em vários trabalhos científicos e pela paciência em esclarecer certas dúvidas que surgiram ao longo do caminho da concretização deste trabalho.*

*À minha amiga Aline Dantas, pela colaboração e ajuda indispensáveis nesta pesquisa e por todos os momentos de descontração compartilhados.*

*À minha orientadora Vilma Lima, pela confiança e oportunidade em realizar este trabalho.*

## RESUMO

### **Efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseos da *Punica granatum L.* combinada ou não com laser de baixa intensidade na perda óssea induzida por ligadura em ratos. –**

Larice Kércia Braz Monteiro. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Data da Defesa: 18 de junho de 2013. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vilma Lima.

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória crônica caracterizada por intensa perda óssea. *P. granatum* (PNG) e Irradiação com Laser de Baixa Intensidade (ILBI) têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades anti-inflamatória e antirreabsortiva óssea da PNG combinada ou não com ILBI na periodontite induzida por ligadura em ratos. A periodontite foi induzida em 72 ratos *Wistar* através da inserção de um fio de nylon-3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo. A hemimaxila contralateral foi utilizada como controle. Grupos de 6 animais receberam solução salina 0,9% (SAL), SAL+ILBI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG (60, 180, 540) mg/kg ou combinação de PNG 540 mg/kg+ILBI 4 J/cm<sup>2</sup>. O laser de baixa intensidade GaAlAs foi aplicado imediatamente após a cirurgia, enquanto a PNG foi administrada, por gavagem, diariamente, até o 11<sup>o</sup> dia, quando, então, os animais foram mortos, suas maxilas removidas e processadas para análises macroscópica, histométrica, histológica e marcação imunohistoquímica para TRAP. Amostras de tecido gengival foram obtidas para avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO). Foram coletadas amostras de sangue para dosagem dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO), leucograma e análise das funções hepática e renal. Adicionalmente, os índices hepático e renal foram realizados. Os ratos foram pesados diariamente. A indução da periodontite causou intensa perda óssea alveolar (POA), redução sérica da FAO, destruição do ligamento periodontal e do cimento, e intensa infiltração leucocitária. Sistemicamente, a periodontite induziu leucocitose e não causou alterações nos níveis séricos de transaminases hepáticas, ureia ou creatinina, bem como nos índices hepático e renal. A POA foi prevenida significativamente por PNG (60= 34%, 180= 34%, 540= 42%), SAL+ILBI= 31% e PNG 540+ILBI= 48% ( $p<0.05$ ). PNG 540 combinada ou não com ILBI preveniu a perda óssea alveolar, a infiltração leucocitária e preservou o periodonto de maxilas nas quais a periodontite foi induzida. Animais tratados com PNG 540+ILBI mostraram significativa redução na imunomarcagem positiva para TRAP (Periodonto Não desafiado=0,0 ± 0,0; SAL= 0,016 ± 0,004; SAL+ILBI= 0,01 ± 0,003; PNG 540= 0,011 ± 0,003; PNG 540+ILBI= 0,002 ± 0,0003). O aumento da atividade de MPO foi prevenido por PNG (60= 46%, 180= 49%, 540= 76%), SAL+ILBI= 54% e PNG 540+ILBI= 80% ( $p<0.05$ ). Embora a redução da FAO observada no grupo salina não tenha sido prevenida por PNG ou SAL+ILBI ( $p>0,05$ ), PNG 540+ILBI causou um aumento significativo nos níveis séricos de FAO (74,2 ± 5,4 U/l), quando comparado ao SAL (44,9 ± 3,0 U/l) ( $p<0,05$ ). Nenhum grupo apresentou mudanças significantes nos níveis séricos de transaminases hepáticas, ureia ou creatinina ou nos respectivos índices hepático e renal ( $p>0,05$ ), e todos os grupos preveniram ( $p<0,05$ ) a leucocitose quando comparada ao grupo SAL. Em suma, PNG combinada ou não com ILBI reduziu a infiltração leucocitária e o número de neutrófilos além de reduzir a perda óssea alveolar, à custa da inibição da ativação de osteoclastos, sem causar alterações sistêmicas importantes.

**Palavras-chave:** *Punica granatum*; Laser de Baixa Intensidade; perda óssea alveolar; inflamação; TRAP.

## ABSTRACT

**Anti-inflammatory and bone antiresorptive effects of *Punica granatum L.* combined or not to low level laser irradiation on ligature-induced bone loss in rats** – Larice Kércia Braz Monteiro. Dissertation submitted as a partial fulfillment of the requirement to degree of Master's title in Dentistry of Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of Ceará Federal University. Defense date: 2013, June 18. Professor: Vilma de Lima.

Periodontitis is a chronic infectious inflammatory disease. *P. granatum* (PNG) and low level laser irradiation (LLLL) have demonstrated anti-inflammatory properties and antioxidants. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory and bone antiresorptive activities of PNG combined or not with LLLL in ligature-induced periodontitis in rats. Periodontitis was induced in 72 rats by inserting a nylon-3.0 around the left upper second molar. The contralateral hemimaxilla was used as control. Groups of 6 animals received saline 0.9% (SAL), SAL+LLLL 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180, 540 (mg/kg)] or PNG 540 mg/kg+LLLL 4 J/cm<sup>2</sup>. The low intensity laser GaAlAs was applied immediately after surgery, while PNG was administered by gavage daily until day 11, when the animals were killed. The jaws were removed and processed for macroscopic, histometric, histological and immunohistochemical staining for TRAP. Gingival tissue samples were obtained to evaluate the activity of myeloperoxidase (MPO). Blood samples were collected for measurement of serum bone alkaline phosphatase (BALP), leukograms and analysis of liver and kidney function. Additionally, indexes of liver and kidney were performed. Rats were weighted daily. Periodontitis induction caused intense alveolar bone loss (ABL), reduction of BALP, cementum and periodontal ligament destructions, and intense leukocyte infiltration. Systemically, periodontitis induced leukocytosis and did not alter hepatic transaminases, urea or creatinine serum levels, or liver and kidney indexes. The ABL was prevented by PNG (60= 34%, 180= 34%, 540= 42%), SAL+LLLL= 31% e PNG 540+LLLL= 48% ( $p<0.05$ ). PNG 540 combined or not with LLLL decreased the alveolar bone resorption, the leukocyte infiltration and preserved the periodontium in the jaws in which the periodontitis was induced. Animals treated with PNG 540+LLLL showed an important decreasing of TRAP positive immunostaining (Periodontium Unchallenged =  $0.0 \pm 0.0$ , SAL=  $0.016 \pm 0.004$ ; SAL+LLLL=  $0.01 \pm 0.003$ ; PNG 540=  $0.011 \pm 0.003$ ; PNG 540+LLLL =  $0.002 \pm 0.0003$ ). The raise of MPO activity was prevented by PNG (60= 46%, 180= 49%, 540= 76%), SAL+LLLL= 54% e PNG 540+LLLL= 80% ( $p<0.05$ ). In spite the reduction of BALP, seen in SAL group was not prevented by SAL+LLLL or PNG ( $p>0.05$ ), the combined treatment with PNG 540+LLLL caused an increase on BALP serum levels ( $74.2 \pm 5.4$  U/l), when compared to SAL ( $44.9 \pm 3.0$  U/l) ( $p<0.05$ ). No change was seen for hepatic transaminases, urea or creatinine serum levels, or in liver and kidney indexes, in all groups ( $p>0.05$ ) and all groups prevented ( $p<0.05$ ) the leukocytosis observed in SAL group. In short, PNG combined or not with LLLL reduced leukocyte infiltration and the number of neutrophils and reduced alveolar bone loss, at the expense of inhibiting osteoclast activation, without causing systemic changes.

**Key words:** *Punica granatum*; Low Level Laser; alveolar bone loss; inflammation; TRAP.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanino aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AsGaAl	Arsênio Gálio e Alumínio
AST	Aspartato aminotransferase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM / SEM	Erro Padrão da Média / Standard Error of the Mean
FAO / BALP	Fosfatase Alcalina Óssea / Bone-specific Alkaline Phosphatase
FAT / TAP	Fosfatase Alcalina Total / Total Alkaline Phosphatase
IL-	Interleucina
ILBI / LLLI	Irradiação com Laser de Baixa Intensidade / Low Level Laser Irradiation
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase / Myeloperoxidase
NOSi / Inos	Óxido Nítrico Sintetase Induzida / Inducible Nitric Oxide Synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido / Superoxide radical
OPG	Osteoprotegerina
PG	Prostaglandina
PMNs	Polimorfonucleares neutrófilos / Polymorphonuclear neutrophils
PNG	<i>Punica granatum</i>
POA / ABL	Perda Óssea Alveolar / Alveolar Bone Loss
RANK	Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio / Reactive Oxygen Species
SAL	Salina / Saline
SOD	Superóxido dismutase / Superoxide dismutase
TNF	Fator de Necrose Tumoral / Tumor Necrosis Factor
TRAP	Fosfatase Ácida Tártaro-Resistente / Tartrate Resistant Acid Phosphatase
α / β	Alfa / Beta



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
Periodontite	10
<i>Punica granatum L.</i>	12
Laser de baixa intensidade Arseniato de Gálio e Alumínio	15
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>3. CAPÍTULO</b>	<b>20</b>
Anti-inflammatory and bone antiresorptive effects of <i>Punica granatum L.</i> combined or not to low level laser irradiation on alveolar bone loss induced in rats.	
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>48</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>
<b>7. APÊNDICE</b>	<b>66</b>
Metodologia	
<b>8. ANEXO</b>	<b>78</b>
Declaração da Comissão de Ética em Pesquisa Animal	78

## 1 INTRODUÇÃO

### Periodontite

A periodontite é uma condição inflamatória crônica de etiologia microbiana que acomete os tecidos de sustentação do dente (LORENCINI *et al.*, 2009), podendo progredir e levar à perda progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar (PAGE; KORNMAN, 1997; KINANE *et al.*, 2011). A periodontite é uma das principais causas de perda dentária em humanos, estando entre um dos problemas orais mais prevalentes (ALBANDAR; RAMS, 2002).

Nesse contexto, a resposta imunoinflamatória do hospedeiro pode contribuir com efeitos protetores (TAUBMAN *et al.*, 2005) ou destrutivos (TAUBMAN *et al.*, 2005; KINANE *et al.*, 2011) na periodontite. Inicialmente, os processos imunológicos e inflamatórios têm como objetivo inibir a invasão e proliferação dos micro-organismos. Em alguns casos, porém, essas reações de defesa podem ser prejudiciais aos tecidos periodontais, havendo uma íntima relação entre a resposta inflamatória e a destruição óssea observada na periodontite (MADIANOS *et al.*, 2005). Nesse processo, os produtos liberados pelas células inflamatórias influenciam a diferenciação e a função dos osteoclastos, causando reabsorção óssea alveolar (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011).

A resposta do hospedeiro consiste basicamente na ativação de macrófagos e linfócitos por endotoxinas, como lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativo (MADIANOS *et al.*, 2005). Essas células liberam mediadores inflamatórios importantes na doença periodontal, tais como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (GRAVES; COCHRAN, 2003), interleucina-6 (IL-6) (JOHANNSEN *et al.*, 2007), prostaglandinas (PGs) (AIRILA-MANSSON *et al.*, 2006) e óxido nítrico (LEITÃO *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  interferem diretamente no processo de reabsorção óssea alveolar ao induzir a proliferação de precursores osteoclásticos, e, indiretamente, ao estimular a ativação e diferenciação de osteoclastos maduros (ASSUMA *et al.*, 1998). Sabe-se que as citocinas TNF- $\alpha$ ,

IL-1- $\beta$  e IL-6 estimulam a expressão de Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B (RANK) e do seu ligante (Ligante de Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B - RANKL) e diminuem a expressão de osteoprotegerina (OPG), o que favorece a reabsorção de tecido ósseo (NAKASHIMA *et al.*, 2000).

Cochran (2008) demonstrou que o metabolismo ósseo na periodontite é regulado por meio do eixo RANK-RANKL-OPG. A ligação da molécula RANKL, expressa em células precursoras de osteoblastos, em seu receptor RANK, expresso em células precursoras de osteoclastos, promove o recrutamento, a ativação e a diferenciação de osteoclastos. Por outro lado, a ligação OPG-RANKL impede a ligação RANK-RANKL, resultando em inibição da osteoclastogênese. Assim, o aumento da expressão de RANKL ou a diminuição de OPG pode levar a um desequilíbrio no eixo RANK-RANKL-OPG em favor da osteoclastogênese (COCHRAN, 2008). Nesse contexto, há relatos na literatura de elevados níveis de RANKL (CROTTI *et al.*, 2003; KAWAI *et al.*, 2006; WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007) e baixos níveis de OPG (CROTTI *et al.*, 2003) em pacientes portadores de doença periodontal.

O efeito de determinadas substâncias químicas utilizadas na terapia periodontal deve estar associado a uma resposta imune direcionada e eficaz contra o patógeno ou à indução de um efeito anti-inflamatório (JUIZ *et al.*, 2010). Exemplificando essa possibilidade como adjuvante ao tratamento periodontal, a literatura mostra que a utilização de agentes inibitórios da produção de citocinas inflamatórias, sobretudo o TNF- $\alpha$ , em modelo de periodontite foi responsável por uma menor destruição óssea e cementária aliada à redução do infiltrado inflamatório (LIMA *et al.*, 2004). Nesse aspecto, o uso de produtos naturais, cujos mecanismos de ação são baseados no controle da resposta inflamatória, pode ser muito promissor no tratamento da periodontite.

### ***Punica granatum L.***

A *Punica granatum L.* é um arbusto ou árvore da família Lythraceae (OLIVEIRA *et al.*, 2010), popularmente conhecida como “romãzeira” (MENEZES *et al.*, 2008), originada de países do Mediterrâneo tais como Irã, Índia e China (FADAVI *et al.*, 2006). Tal planta cresce em áreas quentes, sendo comum em regiões tropicais e subtropicais (MORTON, 1987). Pode atingir até seis metros de altura possuindo folhas simples e flores isoladas, dotadas de cálices esverdeados e duros. Seu fruto, romã, é do tipo baga, com aspecto redondo, de casca coriácea, amarela ou avermelhada, contendo inúmeras sementes envolvidas por um arilo polposo comestível. Possui sabor doce, levemente acidulado (MENEZES *et al.*, 2008) e tem uso medicinal amplamente difundido, podendo ser consumida *in natura* (SEERAM *et al.*, 2005a) ou processada como sucos, vinhos (GIL *et al.*, 2000) e extratos (NEGI; JAYAPRAKASHA, 2003). A romã representou um importante símbolo para diversas culturas. Suas sementes têm sido consideradas agentes da ressurreição pelos babilônios, imprescindíveis nos campos de batalha para os persas, além de representarem longevidade e imortalidade para os antigos chineses (LANSKY; NEWMAN, 2007).

Os frutos da *P. granatum* apresentam em sua composição carboidratos, gorduras, fibras (SANTOS *et al.*, 2010) e estrógenos (estradiol, estrona e estriol) (MORI-OKAMOTO *et al.*, 2004). Outros fitoconstituintes incluem compostos fenólicos como antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (cafeico, catequínico, clorogênico, orto e paracumárico, elágico, gálico e quínico) e taninos (punicalagina) (NODA *et al.*, 2002). Esses últimos constituem os polifenóis mais abundantes presentes no suco da romã sendo um exemplo deles os elagitaninos, formados da ligação do ácido elágico com o hidrato de carbono (MENEZES *et al.*, 2008). O ácido elágico proveniente da degradação de elagitaninos apresenta propriedades anticarcinogênicas (FALSAPERLA *et al.*, 2005) e antioxidantes (HASSOUN *et al.*, 2004). O tanino, princípio ativo do fruto, está concentrado na casca da romã onde se encontra maior teor de punicalaginas (SEERAM *et al.*, 2005a), as

quais têm mostrado atividade antibacteriana contra micro-organismos Gram-negativo e Gram-positivo (NEGI; JAYAPRAKASHA, 2003).

O principal efeito do extrato da romã consiste na redução do estresse oxidativo, podendo ser indicada como adjuvante ao tratamento da periodontite (SHUKLA *et al.*, 2008). Esse efeito antioxidante, como dito anteriormente, pode ser atribuído ao seu alto conteúdo de polifenóis, como taninos condensados, antocianinas e pequenos flavonóides e, em particular, aos seus elagitaninos, sendo os principais as punicalaginas (GIL *et al.*, 2000; SEERAM *et al.*, 2005b; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2006).

Determinados estudos *in vitro* demonstraram que o suco do fruto da *P. granatum*, além de retardar a oxidação e a síntese de prostaglandinas, pode inibir a proliferação de células tumorais, reduzir a invasão tumoral, promover a apoptose e ainda inibir a formação de vasos no modelo *in vitro* da membrana corioalantóide. O óleo de semente de romã tem mostrado capacidade de inibir metaloproteinase de matriz (MMP) e as enzimas ciclo-oxigenase e lipoxigenase (TOI *et al.*, 2003). Estudos acerca do potencial terapêutico do extrato da casca de *P. granatum* L. têm demonstrado capacidade de retardar a proliferação tumoral em diferentes linhagens de células cancerígenas (LANSKY; NEWMAN, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010), tendo demonstrado efeitos benéficos na prevenção e no tratamento do câncer (SEERAM, 2005b). Além disso, estudos prévios demonstram que a *P. granatum* apresenta ações bactericida e bacteriostática sobre micro-organismos Gram-positivo (PEREIRA *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2002; 2003).

Quanto aos estudos em animais, têm-se relatado na literatura os efeitos benéficos da *P. granatum* no tratamento da diabetes (HUANG *et al.*, 2005); da obesidade (HOSSIN, 2009); das infecções do trato respiratório (BACHOUAL *et al.*, 2011); da isquemia cerebral infantil (LOREN *et al.*, 2005); da doença de Alzheimer (HARTMAN *et al.*, 2006) e de infertilidade masculina (TURK *et al.*, 2008). Outras aplicações potenciais incluem atividade cicatrizante (PIRBALOUTI *et al.*, 2010) e redução da perda óssea em ratas ovariectomizadas (MORI-OKAMOTO *et al.*, 2004). Além disso, estudos prévios têm demonstrado os efeitos antiangiogênico e antitumoral da romã a partir da

redução da vascularização da parede abdominal de camundongos portadores de Tumor Ascítico de Erlich (OLIVEIRA *et al.*, 2010; VALADARES *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Hadipour-Jahromy e Mozaffari-Kermani, em 2010, demonstrou o efeito condroprotetor do suco de romã no tratamento da osteoartrite em camundongos, caracterizando-se por ausência de proliferação de células inflamatórias no fluido sinovial e melhora nos aspectos histológicos do osso subcondral e da cartilagem do joelho de camundongos.

A atividade anti-inflamatória da *P. granatum* também vem sendo demonstrada, uma vez que a administração de romã em ratos com fibrose hepática diminuiu os níveis de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, e a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima abundante em neutrófilos, reduziu os níveis basais de estresse oxidativo hepático e diminuiu os danos no DNA (TOKLU *et al.*, 2007). Adicionalmente, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e de IL-6 foram reduzidos em modelo de artrite reumatóide (SHUKLA *et al.*, 2008), bem como em ratos com fibrose hepática (TOKLU *et al.*, 2007).

Somando-se a esses achados, Larrosa *et al.* (2010) avaliaram o efeito anti-inflamatório da romã ou do seu metabólito urolitina-A em ratos com colite aguda. Ambos reduziram diversos marcadores da inflamação na mucosa do cólon, tais como ciclo-oxigenase-2, prostaglandina E sintetase, prostaglandina E<sub>2</sub>, assim como a óxido nítrico sintetase induzida, além de modularem favoravelmente a microbiota do intestino. Esse último efeito da romã também já havia sido descrito por Vasconcelos *et al.* (2006), os quais demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum* sobre micro-organismos Gram-positivo e leveduras, confirmando a presença de princípios ativos antimicrobianos na casca do fruto.

Quanto ao uso etnofarmacológico, têm sido demonstrado efeitos benéficos em doenças cardiovasculares (AVIRAM; DORNFELD, 2001; AVIRAM *et al.*, 2004), bem como na estomatite protética (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Considerando as propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana da romã, Salgado *et al.* (2006) avaliaram os efeitos antigengivite e antiplaca de um gel de *P. granatum* 10%, durante 11 dias, mesmo não apresentando efeitos

adversos, a romã não se mostrou eficiente em prevenir a formação de placa bacteriana ou de gengivite. Por outro lado, em um ensaio clínico realizado por Bhadbhade *et al.* (2011), os efeitos de bochechos de romã, 2 vezes ao dia durante 4 dias, foram semelhantes ao da clorexidina. Nesse mesmo estudo, o extrato de romã mostrou eficácia na inibição *in vitro* de cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*.

Nesse sentido, a *P. granatum* tem se mostrado ser um fito produto bastante versátil, com ações diversas capazes de modular diversas condições, tais como inflamação, infecção, dentre outras, o que tem feito dela alvo interessante para muitos pesquisadores.

### **Laser de baixa intensidade Arseniato de Gálio e Alumínio**

A palavra LASER é uma abreviação para a expressão em inglês “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação (CHUNG *et al.*, 2012). Em 1960, o físico americano Theodore H. Maiman desenvolveu o primeiro aparelho de laser, o qual emitia luz através da estimulação dos elétrons de um cristal de rubi (MAIMAN, 1960).

A terapia com laser vem sendo empregada na odontologia desde o início da década de 1980 (QADRI *et al.*, 2005; BARROS *et al.*, 2008). Há relatos de seu uso para esterilizar canais radiculares (GUTKNECHT *et al.*, 1996), como adjuvante ao tratamento periodontal mecânico (AOKI *et al.*, 2004; QADRI *et al.*, 2005), para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (YILMAZ *et al.*, 2011) e para mucosite (LOPES *et al.*, 2009 e 2010; CARVALHO *et al.*, 2011; LINO *et al.*, 2011). Nesse contexto, tem sido relatada a utilização de lasers de alta (POLIDO, 2005), média (BAHCALL *et al.*, 1992) ou baixa intensidade (LOPES *et al.*, 2009 e 2010; YILMAZ *et al.*, 2011). Os lasers de alta intensidade correspondem aos lasers cirúrgicos; os de média intensidade são usados em fisioterapia e os de baixa intensidade apresentam propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, bem como atividade de bioestimulação (BARROS

*et al.*, 2008). Enquanto os lasers cirúrgicos são amplamente utilizados na clínica odontológica, o uso do laser de baixa intensidade é menos frequente (QADRI *et al.*, 2005), sendo exemplificado pelo laser hélio-neônio ( $\lambda$  633 nm) (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010) e por lasers diodo ( $\lambda$  635-950 nm), como o Arseniato de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (KREISLER *et al.*, 2003).

Especificamente sobre a terapia periodontal, o laser apresenta alguns efeitos desejáveis os quais justificam sua utilização como adjuvante terapêutico nas doenças periodontais. No caso dos lasers de baixa intensidade, podem-se citar suas ações anti-inflamatória (AOKI *et al.*, 2004; QADRI *et al.*, 2005; BRAUN *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2010; AYKOL *et al.*, 2011), cicatrizante (AOKI *et al.*, 2004; BRAUN *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2010) e analgésica (DE SOUZA *et al.*, 2010). Além disso, o laser de alta intensidade possui capacidade de eliminação do tecido de granulação presente em bolsas periodontais (AOKI *et al.*, 2004) e ação bactericida (AOKI *et al.*, 2004; BRAUN *et al.*, 2008). Alguns lasers de alta intensidade têm a capacidade de remover não somente o biofilme dental, mas também o cálculo presente na superfície radicular, o que favorece mais ainda a utilização desses aparelhos em periodontites (AOKI *et al.*, 2004).

No que concerne à utilização do laser de baixa intensidade, Almeida-Lopes *et al.* (2001) observaram que o laser diodo ( $\lambda$  670, 692, 780 e 786 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>) promove a proliferação *in vitro* dos fibroblastos provenientes da mucosa oral humana, não havendo diferenças no caso de lasers com a mesma intensidade e comprimento de onda diferentes. Porém, quando as intensidades são diferentes, o laser infravermelho induziu maior proliferação celular do que o laser visível.

Vários estudos têm sido realizados a fim de avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade em ratos. Garcia *et al.* (2010) observaram que o laser AsGaAl ( $\lambda$  660 nm, 57,14 J/cm<sup>2</sup>) preveniu a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida. Além disso, um estudo desenvolvido por Esteves-Júnior *et al.* (2011) mostrou que o laser de baixa intensidade ( $\lambda$  660nm) (20 mW, 10,36 J/cm<sup>2</sup>, ou 50 mW, 260,7 J/cm<sup>2</sup>) promoveu redução da expressão da



enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no modelo de feridas cutâneas em ratos. Soldá (2010) avaliou a utilização do laser de baixa intensidade ( $\lambda$  780 nm, 30 mW, 4 J/cm<sup>2</sup>) em ratas com hipotireoidismo e observou que o tratamento com laser de baixa intensidade nas condições utilizadas não reverteu a doença nesses animais.

No que se refere aos estudos em humanos, De Souza *et al.* (2010) relataram efeitos analgésico e cicatrizante do laser de baixa intensidade ( $\lambda$  670 nm, 50 mW, 3 J/cm<sup>2</sup>) no controle da dor e no reparo em pacientes portadores de estomatite aftosa recorrente.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar a atividade do laser na periodontite. Nesse contexto, Qadri *et al.* (2005) relataram que a aplicação de laser de baixa intensidade ( $\lambda$  835, 4,5 J/cm<sup>2</sup> e 630 nm, 8,75 J/cm<sup>2</sup>) como adjuvante ao tratamento periodontal reduziu a profundidade de sondagem, o índice gengival, o volume de fluido crevicular gengival e os níveis de MMP-8. Corroborando esses achados, Aykol *et al.* (2011) constataram melhora no índice de sangramento gengival, no nível de inserção clínica, na profundidade de sondagem e na cicatrização periodontal em pacientes que receberam a terapia mecânica associada ao laser AsGaAl ( $\lambda$  808 nm, 4 J/cm<sup>2</sup>).

Embora Qadri *et al.* (2005) relatarem benefícios periodontais quando do uso do laser de baixa intensidade citado acima, os mesmos não observaram diferenças significantes na atividade de elastase, na concentração de IL-1 $\beta$  e na análise microbiológica entre os sítios que receberam placebo ou laser, enquanto que KAMMA *et al.* (2009) observaram que a associação de um laser diodo ( $\lambda$  980 nm; 2 W) e a terapia periodontal mecânica em pacientes portadores de periodontite agressiva mostrou redução significativa na contagem bacteriana total e nos níveis de *P. gingivalis* e *T. denticola*, seis meses após o tratamento, além de melhora no nível clínico de inserção e na profundidade de sondagem de bolsa.

Dentro de um contexto atual em que se buscam novas abordagens adjuvantes à terapia periodontal convencional, ganham destaques diversas abordagens, tais como uso de fármacos e de aparato tecnológico como laser

de baixa intensidade. Assim, diante das características inflamatórias e de perda óssea da periodontite, tornou-se interessante avaliar a influência do tratamento com extrato fluido da casca de *P. granatum* combinado ou não com o laser de baixa intensidade na resposta inflamatória e na perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da PNG combinada ou não com o uso de laser de baixa intensidade na periodontite induzida por ligadura em ratos. Sendo assim, os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito anti-inflamatório da PNG combinada ou não com o uso de laser de baixa intensidade através da análise histológica e da atividade da mieloperoxidase do periodonto;
- Avaliar o efeito antirreabsortivo ósseo da PNG combinada ou não com o uso de laser de baixa intensidade através de análises macroscópica e histométrica do osso alveolar, e marcação imunohistoquímica para TRAP;
- Avaliar o efeito sistêmico da PNG combinada ou não com o uso de laser de baixa intensidade através da dosagem sérica da Fosfatase Alcalina Óssea; leucograma, dosagens bioquímicas das funções hepática e renal e dos índices hepático e renal.

### **3 CAPÍTULO**

**Anti-inflammatory and bone antiresorptive effects of *Punica granatum L.* combined or not to low level laser irradiation on alveolar bone loss induced in rats.**

**Larice Kércia Braz Monteiro *et al.***

Artigo, após as devidas considerações da comissão de avaliação, deverá ser submetido ao periódico *Lasers in Medical Science*, ISSN 1435-604X.

**Original Article –****Anti-inflammatory and bone antiresorptive effects of *Punica granatum L.* combined or not to low level laser irradiation on alveolar bone loss induced in rats.**

Larice Kércia Braz Monteiro *et al.*

Larice Kércia Braz Monteiro.

Department of Clinical Dentistry, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil.

**\*Corresponding Author:** Vilma Lima. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil. Coronel Nunes de Melo Street, 1127 - Rodolfo Teófilo – CEP: 60.420-270, Fortaleza – Ceará – Brasil - Tele/fax: +55-85-3366.83.33 – E-mail address: [villima@yahoo.com.br](mailto:villima@yahoo.com.br) and [vilma@ufc.br](mailto:vilma@ufc.br).

## Abstract

**Background:** Periodontitis is an infectoinflammatory disease. As *P. granatum* (PNG) and Low Level Laser Irradiation (LLLI) demonstrated anti-inflammatory and antioxidant properties, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory and anti-resorptive effects of PNG combined or not with LLLI in ligature-induced periodontitis in rats.

**Methods:** Periodontitis was induced in 72 *Wistar* rats by nylon-3.0 around the second upper left molar. The contralateral hemimaxilla was used as unlighted control. Groups of 6 animals received 0.9% Saline (SAL), SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180, 540 (mg/kg)] or PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>. Low-level GaAlAs laser was applied immediately after the ligature, while PNG was administered by gavage daily until the 11<sup>th</sup> day, when the animals were sacrificed. The maxillae were removed and processed for macroscopic or for histometric and histological analysis, and immunohistochemical staining for TRAP. Gingival samples were collected for myeloperoxidase (MPO) activity. Blood samples were collected for bone-specific alkaline phosphatase (BALP) serum levels dosage, hepatic transaminases, urea and creatinine serum levels and leukograms. Indexes of liver and the kidney were performed. Rats were weighted daily.

**Results:** The ligature-induced bone resorption was accompanied by cementum and periodontal ligament destructions, and reduction of BALP, besides intense leukocyte infiltration. The ABL was prevented by PNG (60= 34%, 180= 34%, 540= 42%), SAL+LLLI= 31% e PNG 540+LLLI= 48% ( $p<0.05$ ). Microscopically, PNG 540 combined or not with LLLI decreased the alveolar bone resorption (Unchallenged=  $0.002 \pm 0.0002$ , SAL=  $0.023 \pm 0.004$ , PNG (60=  $0.02 \pm 0.004$ , 180=  $0.017 \pm 0.002$ , 540=  $0.014 \pm 0.0008$ ), SAL+LLLI=  $0.01 \pm 0.003$  e PNG 540+LLLI=  $0.009 \pm 0.0008$  ( $p<0.05$ ) and cementum resorption, besides a significant reduction of inflammatory infiltration and of osteoclast. Animals treated with PNG 540 mg/kg+LLLI showed an important decreasing of TRAP positive immunostaining (Periodontium Unchallenged =  $0.0 \pm 0.0$ , SAL=  $0.016 \pm 0.004$ ; SAL+LLLI=  $0.01 \pm 0.003$ ; PNG 540=  $0.011 \pm 0.003$ ; PNG 540+LLLI =  $0.002 \pm 0.0003$ ). The raise of MPO activity induced by ligature was prevented by PNG (60= 46%, 180= 49%, 540= 76% mg/kg), SAL+LLLI= 54% e PNG 540+LLLI= 80% ( $p<0.05$ ). The reduction of BALP seen in SAL group was not prevented by SAL+LLLI or PNG ( $p>0.05$ ) alone, while the combined treatment with PNG 540+LLLI caused a significant increase on BALP serum levels ( $74.2 \pm 5.4$  U/l), when compared to SAL ( $44.9 \pm 3.0$  U/l) ( $p<0.05$ ). No change was seen for hepatic transaminases, urea or creatinine serum levels, or in liver and kidney indexes, in all groups, and PNG, SAL+LLLI and PNG 540+LLLI prevented ( $p<0.05$ ) the leukocytosis observed in SAL group 11 days after periodontitis induction ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** PNG combined or not with the LLLI decreased the inflammation and reduced the alveolar bone loss, at the expense of inhibiting osteoclast activation, without causing systemic changes.

**Keywords:** *Punica granatum*; Low Level Laser; alveolar bone loss; inflammation; TRAP.

## INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disease that results in the progressive destruction of the tissues that support the teeth, specifically the gingiva, periodontal ligament, and alveolar bone (WOLF; LAMSTER, 2011). Initially, the host response contributes to tissue protection in order to eliminate the microbial challenge. Nevertheless, it may later trigger destructive events on periodontium, when exacerbated (TAUBMAN *et al.*, 2005; KINANE *et al.*, 2011). In this process, cytokines and inflammatory mediators released by inflammatory cells mediate connective tissue and bone destructions. It has been reported that cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (GRAVES; COCHRAN, 2003) and IL-6 (JOHANNSEN *et al.*, 2007) influence the differentiation and function of osteoclasts (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011), unbalancing the axis of Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B - its Ligand - Osteoprotegerin (RANK-RANKL-OPG), a regulator of bone metabolism (COCHRAN, 2008). The over production of inflammatory mediators stimulate the expression of RANK and RANKL, while it decreases the OPG expression, thus favoring bone resorption (NAKASHIMA *et al.*, 2000).

Therefore, considering the role of host response and inflammation on bone resorption, the use of natural products that demonstrate anti-inflammatory activity can be a very promising approach. Among the several plants of medicinal interest stands out *P. granatum*, a shrub or tree of the Lythraceae family, popularly known as "pomegranate" (MENEZES *et al.*, 2008).

*P. granatum* is originated in the Mediterranean countries, grows well in warm areas and is common in tropical and subtropical regions (MORTON, 1987). Its fruit is berry type, looking round, leathery shell, yellow or reddish, contains numerous seeds surrounded by a pulpy edible aril with sweet, slightly acidic (MENEZES *et al.*, 2008), can be consumed fresh (SEERAM *et al.*, 2005a), or processed as juices, wines (GIL *et al.*, 2000) and extracts (NEGI; JAYAPRAKASHA, 2003).

The therapeutic effects of *P. granatum* are due to its different constituents, including estrogens (estradiol, estrone and estriol) (MORI-OKAMOTO *et al.*, 2004), phenolic compounds such as anthocyanins (delphinidin, cyanidin and pelargonidin), quercetin, phenolic acids (caffeic, catequinic, chlorogenic acid, ortho and paracoumaric, ellagic, gallic and quinic) and tannins (punicalagina) (NODA *et al.*, 2002). Many studies suggest the antibacterial (BHADBHADE *et al.*, 2011), antifungal (VASCONCELOS *et al.*, 2003), antioxidant (GIL *et al.*, 2000; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2006), wound healing (PIRBALOUTI *et al.*, 2010), antihypertensive (AVIRAM; DORNFELD, 2001), anticancer (FALSAPERLA *et al.*, 2005) and, especially, anti-inflammatory properties exerted by this plant or their isolated components (SHUKLA *et al.*, 2008; LARROSA *et al.*, 2010).

Another approach used to modulate host response has been the low-level laser diode irradiation. The use of lasers has become a topic of much interest in periodontal therapy (AOKI *et al.*, 2004). The word "LASER" is an acronym for "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (CHUNG *et al.*, 2012). The positive effects of therapeutic lasers in dentistry has been

reported for several conditions, mainly as adjuvant to periodontal treatment (AOKI *et al.*, 2004; QADRI *et al.*, 2005), due to its bactericidal (AOKI *et al.*, 2004), analgesic (DE SOUZA *et al.*, 2010), anti-inflammatory (AOKI *et al.*, 2004; QADRI *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2010; AYKOL *et al.*, 2011) and healing effects (AOKI *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2010) as well as on the removal of granulation tissue present in periodontal pockets (AOKI *et al.*, 2004).

Thus, considering the role of host response in the process of periodontal bone resorption, and the well-known anti-inflammatory effect of *P. granatum* and of the low level laser irradiation, the purpose of this study was to evaluate the effect of *P. granatum* combined or not to low level laser irradiation in alveolar bone loss on ligature-induced periodontitis in rats.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Seventy-two female *Wistar* rats (180 to 220 g) from our own facilities were used in this study. Animals were acclimatized for at least 1 week before the beginning of the experiment, and were housed on specific cages under temperature-controlled rooms with laboratory chow and water available *ad libitum*. All procedures and animal treatment were previously approved by Institutional Ethics Committee of Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil (Protocol number 70/11).

### *Punica granatum L.*

The fruits of PNG were collected in São Paulo, SP, Brazil. The peel of the fruit was subjected to drying by sun, and an industrial standardized *P. granatum* fluid extract was supplied by Farmácia e Laboratório Homeopático Farma Verde Ltda., Fortaleza, CE, Brazil (Lot 22607). Microbiological tests were performed after production of the extract. In order to be administered by gavage, the PNG was dissolved in 0.9% sterile saline solution.

### Laser

Laser treatment was performed by using a gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) diode laser<sup>1</sup>. The physical parameters used for this study were as follows: wavelength, 660 nm; average output, 100 mW; 1.5 mm spot diameter. It was applied once for 40 seconds to the gingiva of the second left upper molar and the total energy per unit area (fluency) was 4 J/cm<sup>2</sup>. Technique was based on Garcia *et al.* (2010) which used GaAlAs laser with wavelength, 660 nm; average output, 30 mW; contact area 0.07 cm<sup>2</sup> for 133 s per point (3 points on the buccal and lingual 3 points in the 1st molar).

In fact, the protocol used in this study differs according to the application have been performed at only one point on the buccal surface of the 2nd molar left, since this is the area that presents the greatest bone loss in experimental periodontitis model. As to variations in the dose, timing and area of application,

---

<sup>1</sup> ECCO Fibras®, Campinas, SP, Brazil



it is noted that such parameters are calculated according to the variation of the laser device, hence the differences between the present study and the study by Garcia et al. (2010).

### **Induction of bone loss**

A model for induction of bone loss in rats was used as described by Lima *et al.* (2000). A nylon (3-0) thread ligature was placed around the cervix of the second left upper molar of rats anesthetized with chloral hydrated (Vetec<sup>®</sup>, Duque de Caxias, RJ, Brazil) (300 mg/kg, i.p.). The ligature was then knotted on the vestibular side of the tooth, resulting in a subgingival position on the palatal side and supragingival on the buccal side. The contralateral right side was used as the unligated control. The animals were observed until the 11<sup>th</sup> day, period of the most intense alveolar bone loss, when they were then sacrificed. All ligature-induced bone loss was made randomly and blind.

### **Experimental groups**

#### **Control Groups**

The SAL groups were constituted by 6 animals submitted to alveolar bone loss. The animals received, by gavage, 0.9% sterile saline solution (2 ml/kg) 30 minutes before the ligature, and after that, daily for 10 days, when they were then sacrificed. Additional groups (SAL+LLLLI) of 6 animals received, by gavage, 0.9% sterile saline solution (2 ml/kg) combined with GaAIAs diode laser irradiation (4 J/cm<sup>2</sup> for 40 seconds), 30 minutes before the ligature. After that, the animals received SAL daily for 10 days, when they were then sacrificed. For use of unchallenged maxilla, it was used the contralateral of SAL rats that it was not ligated. For histological analyses, additional groups of 6 animals (SAL; SAL+LLLLI) were used.

#### ***Punica granatum L.* Groups**

The animals were subdivided in 3 groups of 6 animals each, which received, by gavage, PNG dissolved in 0.9% sterile saline solution on the doses of 60, 180 and 540 mg/kg, respectively, 30 minutes before ligature, and daily until 11<sup>th</sup> day. Additional groups of 6 animals received, by gavage, *P. granatum* 540 mg/kg, 30 minutes before ligature, combined with GaAIAs diode laser irradiation (4 J/cm<sup>2</sup> for 40 seconds). After that, the animals received only PNG 540 mg/kg, daily for 10 days, when they were then sacrificed. For histological analyses, additional groups of 6 animals [PNG 60, 180 and 540 (mg/kg), and PNG 540+LLLLI] were used.

### **Macroscopic study of alveolar bone**

On the 11<sup>th</sup> day, the animals were sacrificed and their maxillae were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin (Reagen<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) during 24 hours. Following, maxillae were separated in half, dissected and stained with 1% aqueous methylene blue (Vetec<sup>®</sup>, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and placed on microscope slides. By then, they followed to

photographic registration using a digital camera Nikon® (D40, Melville, NY, USA). The measurement of resorption area was made by delimited by region involving occlusal border of vestibular side of the hemimaxilla until bone border. These areas were evaluated by *Image J*® software (Software *Image J* 1.32j, National Institute of Health; EUA) in accordance to methodology described previously (GOES *et al.*, 2010).

### **Histometric analysis**

Extra groups of 6 animals with alveolar bone loss that had received SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG 540 mg/kg or PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, were sacrificed as described above and had their maxillae excised. The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin and were demineralized in 7% acid formic (Dinâmica®, Diadema, SP, Brazil) for 20 days. Following the specimens were dehydrated, embedded in paraffin, and sectioned along the molars in a mesio-distal plane for Hematoxilina and Eosin staining. Sections of 4 µm thickness, corresponding to the area between the first and second molars were evaluated by light microscopy. The histometric analysis was made using the method described by Marques *et al.* (2005), with some modifications. The area of bone loss was calculated through the drawing a line, parallel to the roof of the furcation, in the highest point of the remaining alveolar bone border. The acquired image was sent to a computer program *Image J*® (*Image J* 1.44p, National Institute of Health; EUA) for alveolar bone loss analysis. The sections were made single-blinded examiner.

### **Histological analysis**

The same slides used for histometric analysis were used for histological study. Parameters such as inflammatory cell infiltration, osteoclast number, alveolar bone and cementum integrity were determined in a single-blind manner and graded, by score varying from 0 to 3, based on the intensity of findings, as follow: Score 0: absence of or only discrete cellular infiltration, few osteoclasts, preserved alveolar process and cementum; Score 1: moderate cellular infiltration, presence of some osteoclast, some but minor alveolar process resorption and intact cementum. Score 2: accentuated cellular infiltration, large number of osteoclasts, accentuated degradation of the alveolar process, and partial destruction of cementum; Score 3: accentuated cellular infiltrate, total destruction of alveolar process and cementum (LIMA *et al.*, 2000).

### **Immunohistochemical staining for TRAP**

The same slides used for histometric or histological analysis underwent immunoperoxidase method employing polyclonal antibody to identify the protein-tartar resistant acid phosphatase (TRAP), a specific isoenzyme present in the cytoplasm of multinucleated osteoclasts. Initially, the sections were collected on silanized slides, deparafanizeds in xylene and rehydrated in descending series of alcohols (100-70°). These were washed (3x5 min) in sodium phosphate buffer (PBS) 0.1M at pH 7.4, and immersed in hydrogen

peroxide at 3% in methanol for 30 minutes and washed (5x5 min) with PBS. Subsequently, they were incubated with primary antibody solution containing polyclonal goat anti-obtained in K17 human TRAP (sc30833, concentration of 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted in PBS plus normal donkey serum (017 - 000-001, Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA) for 24 hours at room temperature under stirring. The sections were again washed in PBS (5x5 min) and submitted to a second incubation with biotinylated secondary antibody anti-goat made in donkey (705-066-147, 1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA) diluted in PBS plus normal donkey serum for 1 hour at room temperature with stirring. Sections were again subjected to washing in PBS (5x5 mins) and incubated in peroxidase conjugated streptavidin (1:200, ABC kit, PK6100, Vector Laboratories, CA, USA) diluted in PB to room temperature over 1 hour. The revelation of immunoperoxidase reaction was performed in a PBS solution increased with diaminobenzidina (0.005%), followed by inactivation by several washes in PBS. These sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, diaphanous in xylene and mounted with mounting medium hydrophobic (Erv-mount, Erviegas, SP, Brazil). All immunoperoxidase reactions were accompanied by a negative control by omission of primary or secondary antibody. Sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness, corresponding to the area between the first and second molars were evaluated by light microscopy. The area of immunohistochemical staining for TRAP was calculated through the drawing a line around the regions stained with brown (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2006). The acquired images were sent to a computer program *Image J*<sup>®</sup> (*Image J* 1.44p, National Institute of Health; EUA) for immunohistochemical staining for TRAP analysis. The sections were made single-blinded examiner.

### **Myeloperoxidase (MPO) activity**

MPO activity, a marker for neutrophil presence in inflamed tissue, was also evaluated in sample of gingival tissue, using methodology described by Lima *et al.* (2005). At sacrifice SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180 and 540 (mg/kg)], and PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> groups of animals had a sample of their challenged gingival removed for analysis of MPO activity. The specimens were stored at -80 °C until required for assay. For this, the gingival was weighed and triturated using a polytron Ultraturrax in ice-cold buffer solution [50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5% (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide (H-TAB) solid] homogenized, frozen and thawed, and centrifuged at 4 °C for 20 min (2,147 g). After that, the aliquot was centrifuged (2,147 g) for 10 minutes at 4 °C and held the determination of the MPO activity following the kinetics of the reaction front to hydrogen peroxide. In a 96-wells were added to 7  $\mu\text{l}$  of supernatant from each sample and 200  $\mu\text{l}$  of coloring reagent, prepared just before use and composed of ortho-dianisidine hydrochloride (0.167 mg/ml) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.0005% (w/v) in phosphate buffer (50 mM, pH 6.0). Then, the MPO activity was determined by reading absorbance at 450 nm and values were expressed as amount of MPO activity per gram of tissue.

### **Systemic parameters**

## Serum biochemical dosages

Blood samples were collected from orbital plexus of anesthetized animals of the groups SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180 or 540 (mg/kg)] or PNG (540 mg/kg)+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, before the experiment (baseline) and on the 11<sup>th</sup> day. For the serum dosage of bone-specific alkaline phosphatase (BALP), it was evaluated using the thermoactivation method, by heating the sample into 56 °C for 10 minutes (MOSS; WHITBY, 1975) since BALP is a thermosensible isoform of Total Alkaline Phosphatase (TAP). Therefore BALP serum levels were obtained by the subtraction of Heated Alkaline Phosphatase from TAP serum levels. Liver changes were evaluated through serum dosage of Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT). Kidney changes were evaluated through serum dosage of Urea and Creatinine. For all biochemical dosages, the methodology used followed manufacturer orientations (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa-MG, Brazil). Biochemical analysis was made in a blind manner.

## Liver and kidney indexes and corporal mass variation

By the sacrifice, the liver and left kidney of animals from groups: SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180 and 540 (mg/kg)], or PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> were removed and weighed. Values were expressed as the index of the respective organ (wet weight of each organ divided by the weight of the animal on the day of sacrifice) (SILVA *et al.*, 2010). The treatments did not alter the corporal mass variation of rats.

## Leukogram study

The method used for the analysis of white blood cell counts, as well as its subpopulation (neutrophils and mononuclear cells) was as follows: 20 µl of blood, taken from the rat tail, was added to 380 µl Turk solution. Total white blood cell counts were performed using a Neubauer chamber and the differential counts were made using smears stained by rapid Instant Prov Stain Set<sup>®</sup> (Newprov Produtos para Laboratório; Pinhais, PR, Brazil). White blood cells counts of the groups of animals that received SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG [60, 180 and 540 (mg/kg)], or PNG 540+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, were performed before alveolar bone loss induction, at baseline and 11<sup>th</sup> day. Leukogram study was made in a blind manner.

## Statistical analysis

The data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) or median (and range), where appropriate. Analysis of variance (Anova) followed by Bonferroni's test or Student's t-test, were used to compare means, and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare medians. A  $p < 0.05$  value was considered as indicating significant differences. All calculations were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Prism<sup>™</sup>, Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### ***Macroscopic study of alveolar bone***

The periodontal bone resorption induced by ligature in rat maxillae during 11 days caused a significant alveolar bone loss (Table 1). It was observed root exposition and furcation lesion (Figure 1B), when compared to an unchallenged periodontium (Figure 1A). PNG, in all used doses, was able to prevent the bone resorption at the 11<sup>th</sup> day PNG (60= 34%, 180= 34%, 540= 42%), and the combinations SAL+LLLI or PNG 540+LLLI, they both reduced the bone loss by 31% and 48%, respectively ( $p<0.05$ ).

### ***Histometric study***

The histometric study corroborated the morphometric findings. It was observed that 11 d of ligature-induced alveolar bone loss caused intense alveolar bone loss when compared with the unchallenged periodontium (Table 1). Animals receiving PNG 540 mg/kg combined or not to LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> showed decrease on the alveolar bone resorption, when compared to SAL group ( $p<0.05$ ).

### ***Histological analysis***

The histological analysis of rat maxillae submitted to 11 days of ligature showed an accentuated leukocyte infiltration, intense destruction of alveolar bone and cementum (Table 1; Figure 1G), when compare to unchallenged periodontium (Table 1; Figure 1F). The periodontium of animals treated with PNG 540 mg/kg alone or PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> showed an important decreasing of leukocyte infiltration, preservation of periodontal ligament and cementum, and somewhat presence of trabecular bone in proximal space between first and second molars (Table 1; Figures 1I, 1J). These values were statistically significant ( $p<0.05$ ) when compared to the saline group.

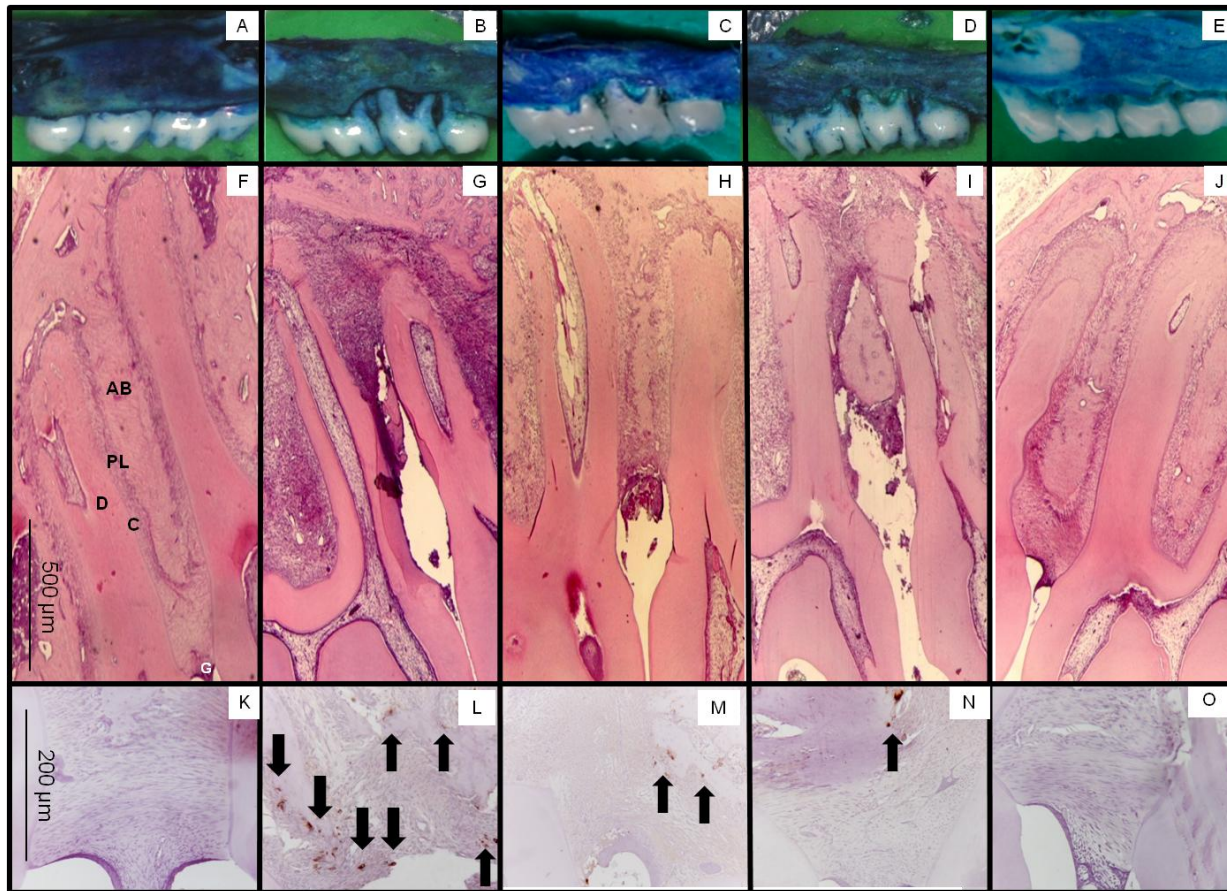
### ***Immunohistochemical staining for TRAP***

Complementing the histological analyses, PNG 540 mg/kg combined or not with LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> significantly reduced the immunohistochemical staining to detect expression of TRAP, when compared to unchallenged periodontium (Figure 1). Quantitative analysis showed that unchallenged periodontium (Table 1; Figure 1K) did not show significant staining for this marker, whilst for the animals of SAL groups (Table 1; Figure 1L), SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> (Table 1; Figure 1M) and PNG 540 mg/kg (Table 1; Figure 1N) showed positive staining for TRAP in a significant manner. On the other hand, animals treated with PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> (Table 1; Figure 1O) showed a significant decreasing of TRAP positive immunostaining.

Table 1 Macroscopic, Histometric, Histological and Immunohistochemical for TRAP Analyses of Rat Maxillae submitted to Periodontitis.

Analysis	Groups	Unchallenged	SAL	SAL + LLLI 4 J/cm <sup>2</sup>	PNG 60 mg/kg	PNG 180 mg/kg	PNG 540 mg/kg	PNG 540 mg/kg + LLLI 4 J/cm <sup>2</sup>
Macroscopic (mm <sup>2</sup> )		-	5.30 ± 0.29	3.66 ± 0.22*	3.55 ± 0.50*	3.59 ± 0.20*	3.13 ± 0.47*	2.84 ± 0.50*
Histometric (mm <sup>2</sup> )		0.002 ± 0.0002	0.023 ± 0.004 <sup>#</sup>	0.018 ± 0.004	0.02 ± 0.004	0.017 ± 0.002	0.014 ± 0.0008*	0.009 ± 0.0008*
Histological (scores)		0 (0-0)	3 (2-3) <sup>#</sup>	2 (2-3) <sup>#</sup>	3 (2-3) <sup>#</sup>	2 (2-2)	2 (0-2) <sup>#,*</sup>	2 (1-2) <sup>#,*</sup>
Immunohistochemical staining for TRAP (mm <sup>2</sup> )		0.00 ± 0.00	0.016 ± 0.004 <sup>#</sup>	0.01 ± 0.003	-	-	0.011 ± 0.003	0.002 ± 0.0003*

Macroscopic, histometric and immunohistochemical for TRAP data represent the mean value ± standard error of the mean (SEM) of alveolar bone loss on vestibular side of maxilla, on the furcation area, or on the region between the first and second molars, respectively, of 7 rats per group, except for immunohistochemistry, which featured 4 specimens each group [Analysis of variance (anova) and Bonferroni tests]. For histological analysis, the data are expressed as the median value followed by range (smaller-larger) of scores [Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests] of regions between the first and second molars of left maxillary half in 7 animals each group. <sup>#</sup>p < 0.05 compared to Unchallenged maxilla; \*p < 0.05 compared to SAL group.

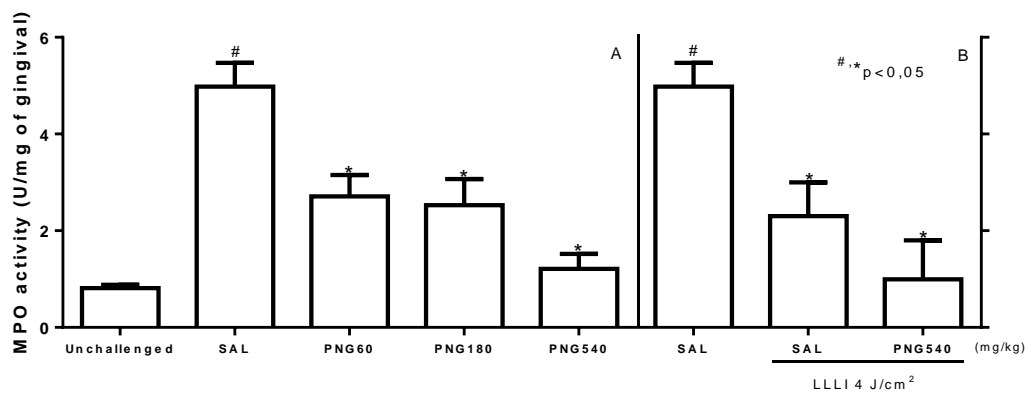


**Fig.1** Macroscopic, microscopic and immunohistochemical findings of the unchallenged periodontium (A, F and K) and of the periodontium of rats subjected to ligature-induced bone loss and receiving saline (SAL) (B, G and L), SAL + Low Level Laser Irradiation (LLLI) 4 J/cm<sup>2</sup> (C, H and M), PNG 540 mg/kg alone (D, I and M), or combination treatment PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> (E, J and O), respectively. The removed maxillae were dissected and photographed or were processed for hematoxylin and eosin staining or for immunostaining for TRAP. Arrows indicate TRAP immunostaining. AB, alveolar bone; C, cementum; D, dentin; G, gingiva; PL, periodontal ligament. Macroscopic original magnification, 7x; histological original magnification, 40x; and immunohistochemical original magnification, 200x.

### ***Myeloperoxidase activity***

MPO activity was measured in the animal gingival tissue as an indicator of neutrophil infiltration. This study showed that the bone loss induced by ligature in rats was caused a significant increase in MPO activity by day 11<sup>th</sup> ( $4.98 \pm 0.49$  U/mg), when compared to unchallenged gingiva ( $0.81 \pm 0.07$  U/mg). PNG 60 ( $2.70 \pm 0.44$  U/mg), 180 ( $2.52 \pm 0.54$  U/mg) and 540 mg/kg ( $1.30 \pm 0.33$  U/mg), SAL+LLLI ( $1.21 \pm 0.31$  U/mg) or PNG 540 mg/kg+LLLI ( $0.99 \pm 0.81$  U/mg) significantly prevented ( $p < 0.05$ ) this elevation of the MPO activity in the gingival tissue by 45%, 49%, 75%, 53% and 80%, respectively, when compared to SAL (Figure 2).

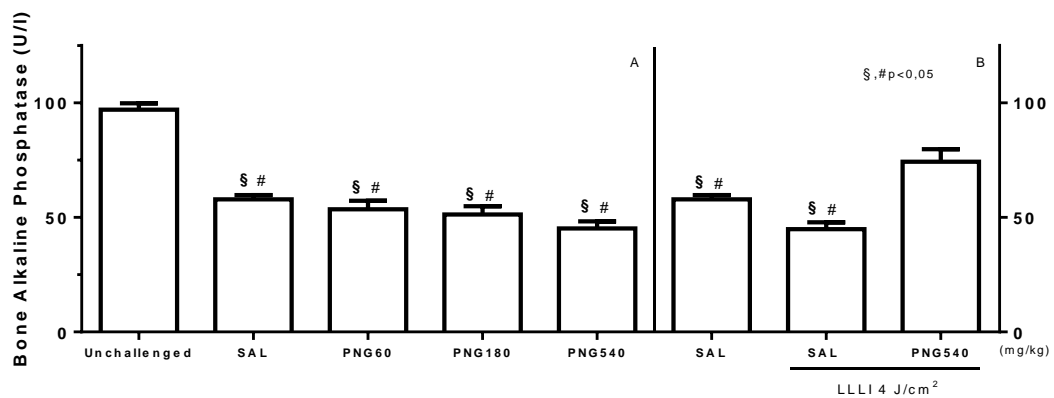




**Fig. 2** Effects of *P. granatum* combined or not to Low Level Laser Irradiation (LLLI) on the MPO activity in animals submitted to ligature-induced periodontitis, receiving Saline, Low Level Laser Irradiation (LLLI) 4 J/cm<sup>2</sup> or *P. granatum* at oral doses of 60, 180 and 540 (mg/kg) or *P. granatum* 540 (mg/kg) combined to Low Level Laser Irradiation (LLLI) 4 J/cm<sup>2</sup>. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. #*p*<0.05 compared to Unchallenged group; \**p*<0.05 compared to Saline group [Data were analyzed by using analysis of variance (anova) and Bonferroni tests].

***Serum dosage of Bone-Specific Alkaline Phosphatase (BALP)***

BALP serum levels in rats submitted to 11 days of ligature were significantly reduced ( $57.9 \pm 1.8$  U/l) by 42%, when compared to baseline data ( $97.0 \pm 2.8$  U/L). Besides the treatment with PNG 60 ( $53.5 \pm 3.7$  U/l), 180 ( $51.2 \pm 3.6$  U/l) and 540 mg/kg ( $45.1 \pm 3.2$  U/l) or SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> ( $44.9 \pm 3.0$  U/l) did not prevent the reduction of BALP serum levels when compared to SAL (Figure 3), the combination of PNG 540 mg/kg+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> ( $74.2 \pm 5.4$  U/l) significantly prevented BALP reduction, when compared to SAL ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3** Serum levels of bone-specific alkaline phosphatase (BALP) in animals submitted to ligature-induced periodontitis, receiving Saline, Low Level Laser Irradiation (LLLI) 4 J/cm<sup>2</sup> or *P. granatum* at oral doses of 60, 180 and 540 (mg/kg) or *P. granatum* 540 (mg/kg) combined to Low Level Laser Irradiation (LLLI) 4 J/cm<sup>2</sup>. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. #*p*<0.05 compared to Unchallenged group; §*p*<0.05 compared to *P. granatum* 540 combined to Low Level Laser Irradiation (PNG+LLLI) group [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

### ***Hepatic transaminases, urea and creatinine biochemical dosages***

Serum dosages of hepatic transaminases (AST and ALT), urea and creatinine were analyzed in animals of SAL, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup>, PNG 60, 180 and 540 mg/kg, and PNG 540+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> groups (Table 2). On the 11<sup>th</sup> day, for AST, ALT, urea and creatinine, there was no statistical difference in Saline when compared to baseline data. Similarly the treatments using PNG, SAL+LLLI and PNG 540+LLLI did not show any alteration when compared to baseline data and Saline group.

### ***Liver and kidney indexes***

Liver and kidney indexes were analyzed in animals of Saline, PNG, SAL+LLLI, and PNG 540+LLLI groups (Table 2). The treatments using PNG in doses of 60, 180 and 540 mg/kg, SAL+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> and PNG 540+LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> did not show any change when compared to Saline group ( $p>0.05$ ).

### ***Leukogram study***

On total leukocyte counts it was observed that periodontitis caused leukocytosis on the 11<sup>th</sup> day after ligature when compared to baseline. This leukocytosis was marked ( $p<0.05$ ) by neutrophilia when compared to baseline. There was no statistical difference of mononuclear cell counts in animals of Saline group when compared to baseline. All experimental groups prevented ( $p<0.05$ ) neutrophilia on the 11<sup>th</sup> day when compared to Saline (Table 2).

Table 2 Effects of *Punica granatum L.* combined or not to Low Level Laser Irradiation on systemic parameters of rats submitted to a periodontitis.

Analysis	Groups						
	Unchallenged	SAL	SAL + LLLI 4 J/cm <sup>2</sup>	PNG 60 mg/kg	PNG 180 mg/kg	PNG 540 mg/kg	PNG 540 mg/kg + LLLI 4 J/cm <sup>2</sup>
AST (U/l)	97.6 ± 2.1	102.3 ± 5.4	103.8 ± 4.5	84.1 ± 13.1	86.3 ± 10.3	91.8 ± 3.1	88.5 ± 8.9
ALT (U/l)	93.4 ± 1.9	92.0 ± 3.3	93.4 ± 5.3	91.3 ± 5.3	82.7 ± 3.8	84.1 ± 2.6	85.5 ± 7.3
Urea (mg/dl)	60.0 ± 1.7	53.0 ± 1.3	60.0 ± 4.2	56.0 ± 2.1	59.0 ± 5.3	49.0 ± 5.6	48.2 ± 4.5
Creatinine (mg/dl)	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2
Liver Index	-	0.004 ± 0.0003	0.004 ± 0.0001	0.003 ± 0.0006	0.003 ± 0.0002	0.004 ± 0.0003	0.004 ± 0.0004
Kidney Index	-	0.039 ± 0.0003	0.036 ± 0.0001	0.036 ± 0.0008	0.036 ± 0.0002	0.035 ± 0.0004	0.036 ± 0.0005
Total leukocytes (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	12.0 ± 0.7	18.5 ± 2.8 <sup>#</sup>	11.0 ± 0.8 <sup>#</sup>	12.2 ± 0.9	11.8 ± 0.9	10.2 ± 1.9 <sup>#</sup>	9.2 ± 1.3 <sup>#</sup>
Neutrophil cells (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.6 <sup>#</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>*</sup>	1.9 ± 0.3 <sup>*</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>*</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>*</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>*</sup>
Mononuclear cells (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	11.1 ± 0.6	14.9 ± 2.4	11.3 ± 1.8	11.3 ± 1.1	10.5 ± 1.0	9.5 ± 1.8	9.0 ± 1.4

<sup>#</sup>p<0.05 compared to Unchallenged group, the baseline values; <sup>\*</sup>p<0.05 compared to Saline group [Data were analyzed by using analysis of variance (anova) and Bonferroni's test]. The indexes correspond to wet weight of organ / body mass at day 11.

## DISCUSSION

We observed that the ligature around second upper molars of rats caused an intense alveolar bone resorption with exposition of roots, accompanied by leukocyte infiltration of periodontal tissues and destruction of cementum, and by reduction on BALP serum level, without any important systemic findings, in accordance with our previously studies (Lima *et al.*, 2004; Leitão *et al.*, 2005; Goes *et al.*, 2012). In the present study, we observed that PNG significantly prevented the ligature-induced alveolar bone loss. Here, the macroscopic and histometric findings were associated to reduction of osteoclast activation and neutrophil infiltration demonstrated by histopathology and MPO activity.

It is known that the ligature-induced bone loss involves important inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL)-1 $\beta$  (GRAVES; COCHRAN, 2003), IL-6 (JOHANNSEN *et al.*, 2007), prostaglandins (PGs) (AIRILA-MANSSON *et al.*, 2006) and nitric oxide (LEITÃO *et al.*, 2005), besides the participation of neutrophils, and considering that PNG possess the ability to inhibit inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (SHUKLA *et al.*, 2008) and prostaglandins (LARROSA *et al.*, 2010), potent stimulators of bone loss (NAKASHIMA *et al.*, 2000), we think that the inhibitory effect of PNG in this study occurred at the expense of modulation of the inflammatory response. In fact, these cytokines stimulate the expression of Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B (RANK) and its ligand (Ligand Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B - RANKL), and decrease the expression of osteoprotegerin (OPG), favoring bone resorption (NAKASHIMA *et al.*, 2000). Furthermore, PNG prevented periodontal inflammation probably by its capacity to decrease some inflammation markers such as cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E synthase, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and consequent nitric oxide production (LARROSA *et al.*, 2010).

In this study, PNG 540 mg/kg caused a significant reduction of leukocyte infiltration of the periodontium, less alveolar bone loss evaluated between roots of first and second molars, and important preservation of periodontal ligament and cementum. These findings are in agreement with Mori-Okamoto *et al.* (2004), which the administration of pomegranate extract for 2 weeks to ovariectomized mice prevented the tibia histomorphometry ovariectomy-induced changes demonstrating anti-inflammatory and reparative effects.

Moreover, as stated earlier, the ligature-induced periodontitis is characterized by an inflammatory process with an outstanding infiltration of leukocytes into tissues, and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are the first cells to infiltrate into the inflammatory site. MPO is an abundant enzyme in the azurophilic granules of neutrophils and it has been used as an indirect marker of neutrophils presence into inflamed sites (MIYASAKI; NEMIROVSKY, 1997). After a stimulus, PMNs are activated initiating a respiratory burst. In this process, there is consumption of molecular oxygen with subsequent formation of a superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), via activation of NADPH oxidase (BABIOR, 2004). This superoxide radical is converted to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the

presence of superoxide dismutase (SOD) (BABIOR, 2004). Although  $H_2O_2$  is not a reactive compound, interacting with MPO, it generates hypochlorous acid (HOCl), a compound that contributes in a deleterious manner to the activity of PMN cells. Thus, it has been established that the level of MPO activity is directly related to the activity of PMNs (KANER *et al.*, 2006) and therefore the degree of tissue inflammation.

Our findings showed that all doses of fluid extract of the bark of PNG prevented the raise of MPO activity induced by 11 days of ligature, indicating an important reduction of neutrophils infiltration in gingival tissues. These findings are in agreement with previous study, which showed that MPO was reduced on human neutrophil reactive oxygen species production *in vitro* model (BACHOUAL *et al.*, 2011). PNG has demonstrated antioxidant properties (HASSOUN *et al.*, 2004) interfering with the formation of reactive oxygen species (ROS), preventing the respiratory burst of neutrophils. In these conditions, the pomegranate extract eliminates free radicals, reducing the levels of hydrogen peroxide and superoxide anion and, consequently, lipid peroxidation (KAUR *et al.*, 2006). In this context, the PNG increases the expression of genes encoding some antioxidants enzymes such as SOD, catalase, or glutathione peroxidase (SUDHEESH; VIJAYALAKSHMI, 2005). The antioxidant effect of pomegranate can be attributed to its high content of polyphenols such as tannins, anthocyanins, flavonoids and, in particular, the ellagic acid and ellagitannins, mainly punicalagins (GIL *et al.*, 2000; MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2006).

Whereas higher doses of *P. granatum* can cause toxicity (PATEL *et al.*, 2008), we sought an additional approach that had synergistic effects without increasing the dose. Indeed it has been shown that the laser enhances the effect of drugs (MDINARADZE, 2006), we sought to evaluate the effect of PNG combined with LLLI. When PNG 540 was combined to LLLI it was seen that PNG+LLLI protected the periodontium in this study. This finding may be explained by the effect of LLLI on inflammatory mediators. It has been shown that LLLI has ability to decreases the mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat (PIRES *et al.*, 2011). Here, the alveolar bone resorption, the leukocyte infiltration and the periodontium destruction characterized by bone loss induction were prevented by administration of the PNG 540+LLLI. Furthermore, it has been described that GaAIA laser (660 nm, 10 J/cm<sup>2</sup>) increased the activity in bone cells, without changing the bone structure in rats perforated femurs (NICOLAU *et al.*, 2003). The low level laser probably acted by modulation of the inflammatory response (PRETEL *et al.*, 2007).

Complementing these results, we evaluated the serum BALP levels, an isoenzyme of total alkaline phosphatase, which is a biochemical indicator of bone formation (CHRISTENSON *et al.*, 1997), since this enzyme is secreted from osteoblast membrane toward matrix vesicles, allowing the mineralization process to occur (BALCERZAK *et al.*, 2003). In spite the reduction of BALP, seen in SAL group was not prevented by SAL+LLLI or PNG ( $p>0.05$ ), the combined treatment with PNG 540+LLLI caused an increase on BALP serum levels, when compared to SAL, indicating its potential bone anabolic. Our

findings are in agreement with previous reports which state that LLLI stimulates DNA and RNA synthesis in the cell nucleus and, consequently, inducing osteoblast precursor cell proliferation and later differentiation (KHADRA *et al.*, 2004), increasing the number of osteoblastic cells. The LLLI also increases the expression of cyclo-oxygenase-2 in bone tissue, enzyme responsible for regulating osteoblastic differentiation genes such as Cbfa-1 and osterix (ZHANG *et al.*, 2002), resulting in bone formation (BOSSINI *et al.*, 2012).

In addition to these anti-resorptive aspects, it was observed that PNG 540 mg/kg combined with LLL 4 J/cm<sup>2</sup> caused a significant reduction of leukocyte infiltration of the periodontium, less alveolar bone loss, and an important preservation of periodontal ligament and cementum. In fact, histological studies have previously demonstrated anti-inflammatory and reparative effects of low level laser in cavities made in the femurs of rats (BLAYA *et al.*, 2008). Furthermore, LLLI reduces IL-1, IL-6 and PGE<sub>2</sub> levels. These mediators are responsible for bone resorption induced osteoclast activation (PALLOTTA *et al.*, 2012).

Osteoclasts are cells that show active high concentration of Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) during the process of bone resorption. TRAP is a specific isoenzyme present in the cytoplasm of multinucleated osteoclasts can be distinguished from those present in other bone cells because of their resistance to being inhibited by tartaric acid. Previous studies have demonstrated that osteoclast-like cells and their precursors stained positively for TRAP (COLE; WALTERS, 1987; ANDERSSON; MARKS, 1989). Therefore, immunostaining with TRAP can be used for identification of cells involved in experimental periodontitis, since this involves an inflammatory process leading to bone resorption (KINANE *et al.*, 2011).

Periodontium of animals submitted to ligature for 11 days showed positive immunostaining for TRAP when compared to unchallenged maxillae. These findings are consistent with previous studies which demonstrated that the experimental periodontitis induces osteoclast activation and bone resorption (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011). Treatment with PNG 540 mg/kg combined with LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> was able to prevent such immunostaining. These findings corroborate data of this study, confirming that the PNG 540 mg/kg combined with LLLI 4 J/cm<sup>2</sup> interferes with activation of osteoclasts and, consequently, in ligature-induced experimental periodontitis.

The treatment with PNG 540+LLLI presented less MPO activity than the PNG 540 mg/kg alone. De Lima *et al.* (2012) demonstrated the antioxidant effect of low level laser irradiation. It was demonstrated that LLLI prevented respiratory burst of neutrophils, reduced ROS generation and the levels of superoxide anion (SILVEIRA *et al.*, 2012). These findings were confirmed by the decrease on SOD and catalase activity (SILVEIRA *et al.*, 2011), which use ROS as substrates.

We found that the combination PNG+LLLI was advantageous probably a synergistic effect on the periodontium of rats. In fact, it has been demonstrated that laser irradiation synergically acts with some pharmacological agents, as



chlorhexidine, eucalyptus, camomile, calendula and indometacin (MDINARADZE, 2006). These effects are due to several factors such as anti-inflammatory actions and biostimulations effects (PALLOTTA *et al.*, 2012).

Systemically, the 11 days of ligature caused a significant leukocytosis, characterized by neutrophilia in the animals. It has been observed that neutrophils may play a more important role in the development and maintenance of the adaptive cellular inflammatory response than previously thought (Lakschevitz *et al.*, 2012). Then, agents that prevent such changes may be important pharmacological tools. We observed that the pomegranate in experimental periodontitis, in all 3 doses, was able to prevent leukocytosis, reducing thus the neutrophilia, when compared to SAL. These findings are in agreement with the study of Patel *et al.* (2008), whereby the oral treatment with pomegranate extract (600 mg/kg for 90 days) in rats resulted in significant reduction in the total number of leukocytes, as well as, neutrophil number. When LLLI was associated with PNG 540, it was seen, once again, the prevention of leukocytosis, and the consequence reduction of neutrophilia. This effect was corroborated by the anti-inflammatory action of LLLI in periodontal therapy (AOKI *et al.*, 2004; QADRI *et al.*, 2005).

In addition, we also evaluated aspects considering the safety PNG administration, through of AST, ALT, urea and creatinine dosages or by liver and kidney indexes. PNG or PNG+LLLI did not alter the serum dosages of hepatic transaminases or the hepatic index when compared to baseline or SAL. AST and ALT are important for evaluation of drug-induced liver damage (SHERMAN, 1991). Treatment with PNG showed a tendency to reduce the serum levels of hepatic transaminases suggesting that PNG may have beneficial effect on the liver (CELIK *et al.*, 2009). Additionally, it was reported by Xu *et al.* (2009) that pomegranate did not alter the liver weight of rats. In fact, when we evaluated the liver index, it did not show any alteration. Urea and creatinine serum levels, as well as the renal index were not altered by PNG or PNG+LLLI treatments when compared to baseline or SAL. These findings are in agreement with previous studies which show that the administration of PNG in rats does not affect significantly the kidney weight (CERDÁ *et al.*, 2003) as well as serum levels of urea and creatinine (TUGCU *et al.*, 2008). Finally, we note that the animals treated with PNG or PNG+LLLI did not present change on corporal mass variation when compared to SAL, being in line with previous studies (SHUKLA *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2008; KHADRA *et al.*, 2004) (data not shown).

Thus, our findings indicate that *P. granatum* combined or not with low level laser irradiation has demonstrated anti-inflammatory and bone anti-resorptive effects on model of experimental bone loss in rats, reducing alveolar bone loss and TRAP immunostaining, MPO activity and leukocyte infiltrate, preserving the periodontium, without cause significant systemic alterations. Meanwhile, further study will be needed to investigate the potential of this plant combined or not with low level laser irradiation in the treatment of periodontitis, with intent to reduce doses of both treatments when in combination.

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge Maria do Socorro França Monte and Conceição da Silva Martins for histological slides. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

## REFERENCES

1. Dana L; Lamster WIB. Contemporary Concepts in the Diagnosis of Periodontal Disease Review Article. Dental Clinics of North America 2011; 55(1): 47-61.
2. Kinane DF, Preshaw PM, Loss BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop of Periodontology. J Clin Periodontol 2011; 38: 44-8.
3. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. J Periodontol 2005; 2033-41.
4. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 2003; 74: 391-401.
5. Johannsen A, Rydmark I, Soder B, Asberg M. Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of depressed women on long-term sick leave. J Periodontal Res 2007; 42: 546-52.
6. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? J Clin Periodontol 2011; 38: 49-59.
7. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol 2008; 79: 1569-76.
8. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, *et al.* Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of nf-kb ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000; 275: 768–75.
9. Menezes SMS, Pinto DMP, Cordeiro LN. Biologics activities *in vitro* and *in vivo* of *Punica granatum L.* (pomegranate). Rev Brasileira Med 2008; 65: 388-91.
10. Morton J. Pomegranate. In: Morton, JF. Fruits of warm climates. Miami: FL 1987; 352-55.
11. Seeram N, Lee R, Hardy M, *et al.* Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Sep Purif Technol 2005a; 41: 49–55.
12. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, *et al.* Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem 2000; 48: 4581-9.
13. Negi PS, Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. J Food Sci 2003; 68: 1473-7.
14. Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, *et al.* Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. J Ethnopharmacol 2004; 92: 93–101.
15. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, *et al.* Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50: 166–71.

16. Bhadbhade SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, *et al.* The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. *Quintessence Int* 2011; 42: 29-36.
17. Vasconcelos LCS, Sampaio MCC, Sampaio CC, *et al.* Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 2003; 46: 192-6.
18. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8956-61.
19. Pirbalouti AG, Koohpayeh A, Karimi I. The wound healing activity of flower extracts of *Punica granatum* and *Achillea kellalensis* in *wistar* rats. *Acta Pol Pharm* 2010; 67(1): 107-10.
20. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001; 158: 195-8.
21. Falsarpela M, Morgia G, Tartarone A. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. *Eur Urol* 2005; 47: 449-55.
22. Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, *et al.* Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition* 2008; 24: 733-43.
23. Larrosa M, González-Sarrías A, Yánes-Gascón MJ, *et al.* Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Bio* 2010; 21: 717-25.
24. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, *et al.* Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology* 2000 2004; 36: 59-97.
25. Chung H, Dai T, Sharma SK, *et al.* The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng* 2012; 2: 516-33.
26. Qadri T, Miranda L, Tuner J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 714-19.
27. De Souza TOF, Martins MAT, Bussadori SK. Clinical evaluation of low-level laser treatment for recurring aphthous stomatitis. *Photomed Las Surg* 2010; 28: S85-S88.
28. Aykol G, Baser U, Maden I, *et al.* The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol* 2011; 82: 481-8.
29. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, *et al.* Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure, and LDL oxidation. *Clin Nutr* 2004; 23: 423-33.
30. Garcia VG, Fernandes LA, De Almeida JM. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Las Med Sci* 2010; 25: 197-206.
31. Lima V, Bezerra MM, Alencar VBM, *et al.* Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 123-9.

32. Goes P, Lima AP, Melo IM, *et al.* Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in *wistar* rats. *Braz Dent J* 2010; 21(3): 193-8.
33. Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, *et al.* Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in ovariectomized rats. *J Periodontol* 2012; 1-18.
34. Silva LMCM, Lima V, Holanda ML, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(5): 830-5.
35. Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, *et al.* Histological study of the effect of laser therapy on bone repair. *The journal of contemporary dental practice* 2008; 9.
36. Airila-mansson S, Soder B, Kari K, *et al.* Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E<sub>2</sub>, interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(6): 1025-31.
37. Leitão RF, Ribeiro RA, Chaves HV, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005; 76(6): 956-63.
38. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74(3): 391-401.
39. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, *et al.* Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci* 2012; 27:71–8.
40. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE<sub>2</sub> secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64(5): 432-44.
41. Cole A, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987; (35): 203-6.
42. Anderson GN, Marks SCJr. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclast. *J Histochem Cytochem* 1989; (37): 115-7.
43. Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, *et al.* Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Las Med Sci* 2003; 18:89–94.
44. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. Effect of low-level *laser* therapy on bone repair: histological study in rats. *Las Surg Med* 2007; 39: 788–96.
45. Miyasaki KT, Nemirovskiy E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol. Immunol* 1997; 12(1): 27-32.
46. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(1): 42-7.
47. Kaner D, Bernimoulin JP, Kleber BM, *et al.* Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2006; 41(2): 132-9.
48. Bachoual R, Talmoudi W, Boussetta T, *et al.* An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase *in vitro* and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1224–8.

49. Hassoun EA, Vodhanel J, Abushaban A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 196-203.
50. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, *et al.* *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 984–93.
51. Sudheesh S, Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Punica granatum* - potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia* 2005; 76: 181-6.
52. De Lima FM, Vitoretti L, Coelho F. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. *Las Med Sci* 2012.
53. Silveira PCL, Da Silva LA, Pinho CA, *et al.* Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Las Med Sci* 2012.
54. Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, *et al.* Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Las Med Sci* 2011; 26: 125–31.
55. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; 30(8): 573–93.
56. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, *et al.* The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4): 1019-38.
57. Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, *et al.* Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 693-700.
58. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, *et al.* Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002; 109: 1405–15.
59. Bossini PS, Rennó ACM, Ribeiro DA. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol* 2012; 47: 136–42.
60. Sherman KE. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. *Arch Intern Med* 1991; 151(2): 260-5.
61. Lakschevitz FS, Aboodi GM, Glogauer M. Oral Neutrophils Display a Site Specific Phenotype Characterized by Expression of T Cell Receptors. *Journal of Periodontology* 2012; 0(0): 1-12.
62. Celik I, Temur A, Isik I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 145–9.
63. Xu KZY, Zhu C, Kim MS. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *J Ethnopharmacol* 2009; 123: 280–7.
64. Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3493-501.

65. Tugcu V, Kemahli E. Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Endourol* 2008; 22(12): 2723-31.
66. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2728–35.
67. Lima C, Brito GAC, Cunha FQ, *et al.* Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifyline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci* 2005; 103: 210-7.
68. Moss DW, Whitby LG. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1975; 61(1): 63-71.
69. Mdinaradze N. Comprehensive treatment of generalized parodontitis. *Georgian Med News* 2006; 135; 60-3.
70. Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol* 2005; 50(4): 421-9.
71. Araújo-Filho JLS, Melo-Júnior MR, Lins CAB, *et al.* Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42(6): 469-75.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Punica granatum L.* é uma herbácea caracterizada por apresentar atividade anti-inflamatória e por prevenir a perda óssea em modelo de ratas ovariectomizadas bem como em modelo de artrite em ratos, potencialmente alterando doenças que afetam o metabolismo ósseo, como a periodontite. Essa atividade de prevenção da reabsorção óssea se deve principalmente à propriedade antioxidante dessa planta, especialmente aos seus elagitaninos, tais como ácido elágico. Neste estudo, optou-se pela utilização do extrato da casca da PNG por ser a parte do fruto com maior teor de taninos hidrolisáveis. Além disso, a PNG também contém estrógenos (estradiol, estrona e estriol) e possui atividade estrogênica, o que contribui com o seu efeito antirreabsortivo.

Adicionalmente, estudos prévios têm mostrado que o laser de baixa intensidade também apresenta atividade anti-inflamatória além de favorecer a proliferação e diferenciação de osteoblastos e, dessa forma, a osteogênese.

Considerando que doses mais elevadas de *P. granatum* podem causar toxicidade, buscamos uma abordagem adicional que pudesse ter efeitos sinérgicos sem aumentar a dose de ambas as abordagens. Neste estudo buscou-se, portanto, demonstrar que a administração de *P. granatum* combinada ou não com o laser de baixa intensidade diodo Arseniato de Gálio e Alumínio resultaria em menor perda óssea alveolar em modelo de perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Ainda, objetivou-se avaliar se essa combinação atuaria potencializando a prevenção da perda óssea alveolar. Assim, estando de acordo com essa hipótese inicial, os nossos achados mostram que a *P. granatum*, nas diversas doses estudadas, bem como a combinação dessa planta na maior dose (540 mg/kg) com a irradiação com laser diodo Arseniato de Gálio e Alumínio na dose de 4 J/cm<sup>2</sup> preveniram a perda óssea e o processo inflamatório observados no 11<sup>o</sup> dia de periodontite experimental. Observou-se ainda que essa combinação potencializou os efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da *P. granatum* ou do laser de baixa intensidade isolados, mostrando-se válida no tratamento da periodontite experimental induzida por ligadura em ratos.



Levando em consideração que, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a administração de extrato fluido da casca de *P. granatum* combinada com o laser de baixa intensidade na prevenção da perda óssea alveolar, tornam-se necessários novos estudos com o intuito de testar o potencial dessa combinação como adjuvante ao tratamento da periodontite.

## 5 CONCLUSÃO

- A *P. granatum* combinada ou não com laser de baixa intensidade demonstrou efeito anti-inflamatório nas maxilas de ratos submetidos à perda óssea induzida por ligadura, protegendo o periodonto de sustentação dos dentes, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente a atividade de MPO e prevenir a leucocitose observada no 11<sup>o</sup> dia de periodontite experimental;
- A *P. granatum* 540 mg/kg combinada com laser de baixa intensidade preveniu a perda óssea por redução da ativação de osteoclastos uma vez que preveniu a redução dos níveis séricos de FAO e a imunomarcação para TRAP;
- A *P. granatum* combinada ou não com laser de baixa intensidade não causou alterações sistêmicas no leucograma e nos níveis séricos de enzimas hepáticas ou renais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRILA-MANSSON, S., SODER, B., KARI, K., MEURMAN, J. H. Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E2, interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. J Periodontol, v. 77, n. 6, p. 1025-31, 2006.

ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. Periodontol 2000, v. 29, p. 7–10, 2002.

ALMEIDA-LOPES, L., RIGAL, J., ZÂNGARO, R. A., GUIDUGLI-NETO, J., JAEGER, M. M. M. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. Lasers Surg Med, v. 29, p. 179-84, 2001.

AOKI, A., SASAKI, K. M., WATANABE, H., ISHIKAWA, I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000, v. 36, p. 59–97, 2004.

ARAÚJO-FILHO, J. L. S., MELO-JÚNIOR, M. R., LINS, C. A. B., LINS, R. A. B., MACHADO, M. C. F. P., CARVALHO, L. B., PONTES FILHO, N. T. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. J Bras Patol Med Lab, v. 42, n. 6, p. 469-75, 2006.

ASSUMA, R., OATES, T., COCHRAN, D., AMAR, S., GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol, v. 160, n. 1, p.403-9, 1998.

AVIRAM, M., DORNFELD, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis, v. 158, p. 195-8, 2001.

AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., GAITINI, D., NITECKI, S., HOFFMAN, A., DORNFELD, L., VOLKOVA, N., PRESSER, D., ATTIAS, J., LYKER, H., HAYEK, T. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clin Nutr, v. 23, p. 423-33, 2004.

- AYKOL, G., BASER, U., MADEN, I., KAZAK, Z., ONAN, U., TANRIKULU-KUKUK, S., ADEMOGLU, E., ISSEVER, H., YAUSSIN, F. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. J Periodontol, v. 82, p. 481-8, 2011.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. Curr Opin Immunol, v. 16, n. 1, p. 42-7, 2004.
- BACHOUAL, R., TALMOUDI, W., BOUSSETTA, T., BRAUT, F., EL-BENNA, J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. Food Chem Toxicol, v.49, p.1224–8, 2011.
- BAHCALL, J., HOWARD, P., MISERENDINO, L., WALIA, H. Preliminary Investigation of the Histological Effects of Laser Endodontic Treatment on the Periradicular Tissues in Dogs. J Endod, v. 18, n. 2, 1992.
- BALCERZAK, M., HAMADE, E., ZHANG, L., PIKULA, S., AZZAR, G., RADISSON, J., BANDOROWCIZ-PIKULA, J., BUCHETE, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. Acta Biochim Pol, v. 50, n. 4, p. 1019-38, 2003.
- BARROS, F. C., ANTUNES, S. A., FIGUEREDO, C. M. S., FISCHER, R. G. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. R Ci Méd Biol, v.7, n.1, p.85-9, 2008.
- BHADBHADDE, S. J., ACHARYA, A. B., RODRIGUES, S. V., THAKUR, S. L. The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. Quintessence Int, v. 42, p. 29-36, 2011.
- BLAYA, D. S., GUIMARÃES, M. B., POZZA, D. H., WEBER, J. B., DE OLIVEIRA, M. G. Histological study of the effect of laser therapy on bone repair. J Contemp Dent Pract, v. 9, n. 6, 2008.
- BOSSINI, P. S., RENNÓ, A. C. M., RIBEIRO, D. A. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. Exp Gerontol, v. 47, p. 136–42, 2012.

- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood, v. 60, n. 3, p. 618-22, 1982.
- BRAUN, A., DEHN, C., KRAUSE, F., JEPSEN, S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. J Clin Periodontol, v. 35, p. 877–84, 2008.
- BUSNARDO, V. L., BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. Rev Bras Fisioter, v. 14, n. 1, p.45-51, 2010.
- CARVALHO, P. A. G., JAGUAR, G. C., PELLIZZON, A. C., PRADO, J. D., LOPES, R. N., ALVES, F. A. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: A double-blind randomized study in head and neck cancer patients. Oral Oncol, v. 47, p. 1176–81, 2011.
- CELIK, I., TEMUR, A., ISIK, I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. Food Chem Toxicol, v. 47, p. 145–9, 2009.
- CERDÁ, B., CERÓN, J. J., TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. J Agric Food Chem, v. 51, p. 3493-501, 2003.
- CHRISTENSON, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin Biochem, v. 30, n. 8, p. 573–93, 1997.
- CHUNG, H., DAI, T., SHARMA, S. K., HUANG, Y. Y., CARROLL, J. D., HAMBLIN, M. R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. Ann Biomed Eng, v. 2, p. 516–33, 2012.
- COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol, v. 79, n. 8, p.1569-76, 2008.
- CROTTI, T., SMITH, M. D., HIRSCH, R., SOUKOULIS, S., WEEDON, H., CAPONE, M., AHERN, M. J., HAYNES, D. Receptor activator NF kappa B

ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res, v. 38, n. 4, p. 380-7, 2003.

DE LIMA, F. M., VITORETTI, L., COELHO, F. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. Las Med Sci, 2012.

DE SOUZA, T. O. F., MARTINS, M. A. T., BUSSADORI, S. K. Clinical evaluation of low-level laser treatment for recurring aphthous stomatitis. Photomed Las Surg, v. 28, p. S85-S88, 2010.

ESTEVEES JUNIOR, I., MASSON, I. B., OSHIMA, C. T. F., PAIOTTI, A. P. R., LIEBANO, R. E., PLAPLER, H. Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats. Lasers Med Sci, 2011.

FADAVI, A., BARZEGAR, M., AZIZI, M. H. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. J Food Comp Anal, v. 19, p. 676–80, 2006.

FALSARPELA, M., MORGIA, G., TARTARONE, A. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. Eur Urol, v. 47, p. 449–55, 2005.

GARCIA V. G., FERNANDES, L. A., DE ALMEIDA, J. M., BOACO, A. F., NAGATA, M. J. H., MARTINS, T. M., OKAMOTO, T., THEODORO, L. H. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. Lasers Med Sci; v. 25, p. 197–206, 2010.

GARCIA, V. G., GUALBERTO JÚNIOR, E. C., FERNANDES, L. A., BOSCO, A. F., NAGAT, M. J. H., CASATTI, C. A., ERVOLINO, E., THEODORO, L. H. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in ovariectomized rats. J Periodontol, p. 1-18, 2012.

GIL, M. I., TOMAS-BARBERAN, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. H., KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with

phenolic composition and processing. J Agric Food Chem, v. 48, p. 4581-9, 2000.

GOES, P., LIMA, A. P., MELO, I. M., RÊGO, R. O. C. C., LIMA, V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in *wistar* rats. Braz Dent J, v. 21, n. 3, p. 193-8, 2010.

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

GUTKNECHT, N., MORITZ, A., CONRADS, G., SIEVERT, T., LAMPERT, F. Bactericidal effect of the nd:yag laser in in vitro root canals. J Clin Las Med Surg, v. 14, n. 2, 1996.

HADIPOUR-JAHROMY, M., MOZAFFARI-KERMANI, R. Chondroprotective Effects of Pomegranate Juice on Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis of the Knee Joint of Mice. Phytother Res, v. 24, p. 182–5, 2010.

HARTMAN, R. E., SHAH, A., FAGAN, A. M., SCHWETYE, K. E., PARSADANIAN, M., SCHULMAN, R. N., FINN, M. B., HOLTZMAN, D. M. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis, v. 24, p. 506-15, 2006.

HASSOUN, E. A., VODHANEL, J., ABUSHABAN, A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. J Biochem Mol Toxicol, v. 18, p. 196-203, 2004.

HOSSIN, F. L. A. Effect of Pomegranate (*Punica granatum*) Peels and It's Extract on Obese Hypercholesterolemic Rats. Pakist J Nutr, v. 8, n. 8, p. 1251-7, 2009.

HUANG, T. H. W. B., YANG, Q., HARADA, M., LI, G. Q., YAMAHARA, J., ROUFOGALIS, B. D., LI, Y. Pomegranate Flower Extract Diminishes Cardiac Fibrosis in Zucker Diabetic Fatty Rats. Modulation of Cardiac Endothelin-1 and

Nuclear Factor-kappaB Pathways, J Cardiovasc Pharmacol, v. 46, p. 856-62, 2005.

JOHANNSEN, A., RYDMARK, I., SODER, B., ASBERG, M. Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of depressed women on long-term sick leave. J Periodontal Res, v. 42, n. 6, Dec, p. 546-52, 2007.

JUIZ, P. J. L., ALVES, R. J. C., BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Braz J Pharmacogn, v. 20, n. 1, p. 134-9, 2010.

KAMMA, J. J., VASDEKIS, V. G. S., ROMANOS, G. E. The effect of diode laser (980 nm) treatment on aggressive periodontitis: evaluation of microbial and clinical parameters. Photomed Las Surg, v. 27, n. 1, 2009.

KANER, D., BERNIMOULIN, J. P., KLEBER, B. M., HEIZMAN, W. R., FRIEDMANN, A. Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. J Periodontal Res, v. 41, n. 2, p. 132-9, 2006.

KAUR, G., JABBAR, Z., ATHAR, M., ALAM, M. S. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food Chem Toxicol, v. 44, p. 984–93, 2006.

KAWAI, T., MATSUYAMA, T., HOSOKAWA, Y., MAKIHIRA, S., SEKI, M., KARIMBUX, N. Y., GONÇALVES, R. B., VALVERDE, P., DIBART, S., LI, Y. P., MIRANDA, L. A., ERNST C. W., IZUMI, Y., TAUBMAN, M. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. Am J Pathol, v. 169, n. 3, p. 987-98, 2006.

KHADRA, M., KASEM, N., HAANAES, H. R., ELLINGSEN, J. E., LYGSTADAAS, S. P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 97, p. 693-700, 2004.



KINANE, D. F., PRESHAW, P. M., LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-- consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol, v. 38, n. 11, p. 44-8, 2011.

KREISLER, M., CHRISTOFFERS, A. B., WILLERSTAUSEN, B., D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. J Clin Periodontol, v. 30, n. 353-8, 2003.

LANSKY, E. P., NEWMAN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol, v. 109, p. 177-206, 2007.

LARROSA, M., GONZÁLES-SARRÍAS, A., YÁNES-GASCÓN, M. J., SELMA, M. V., AZORÍN-ORTUÑO, M., TOTI, S., TOMÁS-BARBERÁN, F., DOLARA, P., ESPÍN, J. C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. J Nutr Bio, v. 21, p. 717-25, 2010.

LEITÃO, R. F., RIBEIRO, R. A., CHAVES, H. V., ROCHA, F. A. C., LIMA, V., BRITO, G. A. C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Periodontol, v. 76, n. 6, p. 956-63, 2005.

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

LIMA, V., BRITO, G. A., CUNHA, F. Q., REBOUÇAS, C. G., FALCÃO, B. A. A., AUGUSTO, R. F., SOUZA, M. L. P., LEITÃO, B. T., RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. Eur J Oral Sci, v. 113, n. 3, Jun, p. 210-7, 2005.

LIMA, V., VIDAL, F. D. P., ROCHA, F. A. C., BRITO, G. A. C., RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and

thalidomide in short-term experimental periodontal disease in rats. J Periodontol, v. 75, n. 1, p.162-8, 2004.

LINO, M. D. M. C., CARVALHO, F. B., OLIVEIRA, L. R., MAGALHÃES, E. B., PINHEIRO, A. L. B., RAMALHO, L. M. P. laser phototherapy as a treatment for radiotherapy-induced oral mucositis. Braz Dent J, v. 22, n. 2, p. 162-5, 2011.

LOPES, N. N. F., PLAPLER, H., CHAVANTES, M. C., LALLA, R. V., YOSHIMURA, E. M., ALVES, M. T. S. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. Support Care Cancer, v. 17, p. 1409–15, 2009.

LOPES, N. N. F., PLAPLER, H., LALLA, R. V., CHAVANTES, M. C., YOSHIMURA, E. M., DA SILVA, M. A. B., ALVES, M. T. S. Effects of Low-Level Laser Therapy on Collagen Expression and Neutrophil Infiltrate in 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Hamsters. Lasers Surg Med, v. 42, p. 546–52, 2010.

LOREN, D. J., SEERAM, N. P., SCHULMAN, R. N., HOLTZMAN, D. M. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Pediatr Res, v. 57, n. 2, p. 858-64, 2005.

LORENCINI, M., SILVA, J. A., ALMEIDA, C. A., BRUNI-CARDOSO, A., CARVALHO, H. F., STACH-MACHADO, D. R. A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. Tissue Cell, v. 41, n. 1, p. 43-50, 2009.

MACHADO, T. B., LEAL, I. C. R., AMARAL, A. C. F., DOS SANTOS, K. R. R., DA SILVA, M. G., KUSTER, R. M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J Braz Chem Soc, v. 13, p. 606-10, 2002.

MACHADO, T. B., PINTO, M. C. F. R., LEAL, I. C. R., SILVA, M. G., AMARAL, A. C. F., KUSTER, R. M., DOS SANTOS, K. R. N. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues,

against methicillin-resistant staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents, v. 21, p. 279-84, 2003.

MADIANOS, P. N., BOBETSIS, Y. A., KINANE, D. F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. J Clin Periodontol, v. 32, n. 6, p. 57–71, 2005.

MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. Nature, v. 187, p. 493-4, 1960.

MARQUES, M. R., DA SILVA M. A., MANZI, F. R., CESAR-NETO, J. B., NOCITI, F. H., BARROS, S. P. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. Arch Oral Biol, v. 50, n. 4, p. 421-9, 2005.

MDINARADZE, N. Comprehensive treatment of generalized parodontitis. Georgian Med News, v. 135, p. 60-3, 2006.

MENEZES, S. M. S., PINTO, D. M. P., CORDEIRO, L. N. Biologics activities *in vitro* and *in vivo* of *Punica granatum L.* (pomegranate). Rev Brasileira Med, v. 65, p. 388-91, 2008.

MERTENS-TALCOTT, S. U., JILMA-STOHLAWETZ, P., RIOS, J. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. J Agric Food Chem, v. 54, p. 8956-61, 2006.

MIYASAKI, K. T., NEMIROVSKIY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol, v. 12, n. 1, p. 27-32, 1997.

MORI-OKAMOTO, J., OTAWARA-HAMAMOTO, Y., YAMATO, H., YOSHIMURA, H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. J Ethnopharmacol, v. 92, p. 93–101, 2004.

MORTON, J. Pomegranate. In: Morton, JF. Fruits of warm climates. Miami: FL; p. 352-55, 1987.

MOSS, D. W., WHITBY, L.G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin Chim Acta, v. 61, n. 1, p. 63-71, 1975.

NAKASHIMA, T., KOBAYASHI, Y., YAMASAKI, S., KAWAKAMI, A., EGUCHI, K., SASAKI, H., SAKAI, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun, v. 275, n. 3, p. 768-75, 2000.

NEGI, P. S., JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. J Food Sci, v. 68, p. 1473-7, 2003.

NICOLAU, R. A., JORGETTI, V., RIGAU, J., PACHECO, M. T. T., DOS REIS, L. M., ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. Las Med Sci, v. 18, p. 89–94, 2003.

NODA Y, KANEYUKI T, MORI A, PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: Delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. J Agric Food Chem, v. 50, p. 166–71, 2002.

NUSSBAUM, G., SHAPIRA, L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? J Clin Periodontol, v. 38, n.11, p.49-59, 2011.

OFFENBACHER, S., HEASMAN, P. A., COLLINS, J. G. Modulation of host PGE<sub>2</sub> secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol, v. 64, n. 5, p. 432-44, 1993.

OLIVEIRA, L. P., PINHEIRO, R. C., VIEIRA, M. S., PAULA, J. R., BARA, M. T. F., VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum L.*, Punicaceae. Braz J Pharmacogn, v. 20, n. 2, p. 201-7, 2010.

PAGE, R. C., KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000, v. 14, p. 9-11, 1997.

- PALLOTTA, R. C., BJORDAL, J. M., FRIGO, L., LEAL JÚNIOR, E. C. P., TEIXEIRA, S., MARCOS, R. L., RAMOS, L., MESSIAS, F. M., LOPES-MARTINS, R. A. B. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. Lasers Med Sci, v. 27, p. 71–8, 2012.
- PATEL, C., DADHANIYA, P., HINGORANI, L. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. Food Chem Toxicol, v. 46, p. 2728–35, 2008.
- PEREIRA, J. V., VIEIRA, M. S., PEREIRA, F. C., SAMPAIO, M. C. C., ALVES, P. M., ARAÚJO, C. R. F., HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum Linn.* sobre microrganismos do biofilme dental. Braz J Pharmacogn, v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.
- PIRBALOUTI, A. G., KOOHPAYEH, A., KARIMI, I. The wound healing activity of flower extracts of *Punica granatum* and *Achillea kellalensis* in wistar rats. Acta Pol Pharm, v. 67, n. 1, p. 107-10, 2010.
- PIRES, D., XAVIER, M., ARAÚJO, T., SILVA Jr., J. A., AIMBIRE, F., ALBERTINE, R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. Lasers Med Sci, v. 26, p. 85–94, 2011.
- POLIDO, C. B. Efeito do laser de diodo (808 nm) de alta potencia no crescimento de cultura de células de fibroblastos humanos. ipen – autarquia associada à universidade de são paulo. dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre profissional na área de lasers em odontologia. 2005.
- PRETEL, H., LIZARELLI, R. F. Z., RAMALHO, L. T. O. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. Las Surg Med, v. 39, p. 788–96, 2007.
- QADRI, T., MIRANDA, L., TUNER, J., GUSTAFSSON, A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. J Clin Periodontol, v. 32, p. 714–9, 2005.

SALGADO, A. D. Y., MAIA, J. L., PEREIRA, S. L. S., LEMOS, T. L. G., MOTA, O. M. L. Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing *Punica granatum Linn* extract. A double-blind clinical study in humans. J Appl Oral Sci, v. 14, n. 3, p. 162-6, 2006.

SALLAY, K., SANAVI, F., RING, I., PHAM, P., BEHLING, U. H., NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. Journal of periodontal research, v.17, n.3, p.263-74. 1982.

SANTOS, E. H. B., BATISTA, F. P. R., PEREIRA, L. M., CAMPOS, L. M. A., CASTRO, M. S., AZEVÊDO, L. C. Composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum L.*). 2010.

SEERAM, N. P., ADAMS, L. S., HENNING, S. M., NIU, Y., ZHANG, Y., NAIR, M. G., HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem, v. 16, p. 360-7, 2005b.

SEERAM, N., LEE, R., HARDY, M., HEBER, D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Sep Purif Technol, v. 41, p. 49–55, 2005a.

SHERMAN, K. E. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. Arch Intern Med, v. 151, n. 2, p. 260-5, 1991.

SHUKLA, M., GUPTA, K., RASHEED, Z., KHAN, K. A., HAQQUI, T. M. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. Nutrition, v. 24, p. 733-43, 2008.

SILVA, L. M. C. M., LIMA, V., HOLANDA, M. L., *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. Biol Pharm Bull, v. 33, n. 5, p. 830-5, 2010.

SILVEIRA, P. C. L., DA SILVA, L. A., PINHO, C. A., DE SOUZA, P. S., RONSANI, M. M., SCHEFFER, D. L., PINHO, R. A. Effects of low-level laser

therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. Las Med Sci, 2012.

SILVEIRA, P. C. L., SILVA, L. A., FREITAS, T. P., LATINI, A., PINHO, R. A. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. Las Med Sci, v. 26, p. 125–31, 2011.

SOLDÁ, A. C. Efeitos do *laser* em baixa intensidade em ratos *Wistar* com hipotireoidismo induzido pelo propiltiouracil (ptu). Dissertação de mestrado profissionalizante de laser em odontologia. Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo. *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)* - autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2010.

SUDHEESH, S., VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Punica granatum*—potential antiperoxidative agents. Fitoterapia, v. 76, p. 181-6, 2005.

TAUBMAN, M. A., VALVERDE, P., HAN, X., KAWAI, T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. J Periodontol, p. 2033-41, 2005.

TOI, M., BANDO, H., RAMACHANDRAN, C., MELNICK, S. J., IMAI, A., FIFE, R. S., CARR, R. E.; OIKAWA, T., LANSKY, E. P. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. Springer Netherlands, v. 6, p. 121-8, 2003.

TOKLU, H. Z., SEHIRLI, O., SENER, O., DUMLU, M. U., ERCAN, F., GEDIK, N., GÖKMEN, V. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. J Pharmacy Pharmacol, v. 59, n. 9, p. 1287-95, 2007.

TUGCU, V., KEMAHLI, E. Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. J Endourol, v. 22, n. 12, p. 2723-31, 2008.

TURK, G., SONMEZ, M., AYDIN, M., YUCE, A., GUR, S., YUKSEL, M., AKSU, E. H., AKSOY, H. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality,

spermatogenic cell density, antioxidant activity, and testosterone level in male rats. Clin Nutr, v. 27, p. 289-96, 2008.

VALADARES, M. C., PEREIRA, E. R. T., BENFICA, P. L., PAULA, J. R. Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. Braz J Pharm Sci, v. 46, n. 1, 2010.

VASCONCELOS, L. C. S., SAMPAIO, F. C., SAMPAIO, M. C. C., PEREIRA, M. S. V., HIGINO, J. S., PEIXOTO, M. H. P. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz Dent J, v. 17, n. 3, p. 223-7, 2006.

VASCONCELOS, L. C. S., SAMPAIO, M. C. C., SAMPAIO, C. C., HIGINO, J. S. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Mycoses, v. 46, p. 192-6, 2003.

WARA-ASWAPATI, N., SURARIT, R., CHAYASADOM, A., BOCH, J. A., PITIPHAT, W. RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. J Periodontol, v. 78, n. 6, p. 1062-9, 2007.

XU, K. Z. Y., ZHU, C., KIM, M. S. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. J Ethnopharmacol, v. 123, p. 280–7, 2009.

YAMAMOTO-SILVA, F. P., BRADASCHIA-CORREA, V., LIMA, L. A., ARANA-CHAVEZ, V. E. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. Microsc Res Tech, v. 76, n. 6, p. 633-40, 2013.

YILMAZ, H. G., KURTULMUS-YILMAZ, S., CENGIZ, E., BAYINDIR, H., AYKAC, Y. Clinical evaluation of Er, Cr:YSGG and GaAlAs laser therapy for treating dentine hypersensitivity: A randomized controlled clinical trial. J Dentist, v. 39, p. 249-54, 2011.

ZHANG, X., SCHWARZ, E. M., YOUNG, D. A., PUZAS, J. E., ROSIER, R. N., O'KEEF, R. J. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation



into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. J Clin Invest, v. 109, p. 1405–15, 2002.

## 7 APÊNDICE

### METODOLOGIA

#### 1. Animais

Para este estudo foram utilizadas 72 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas, divididas em grupos contendo 6 animais cada, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC, transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (FaMed, UFC-Fortaleza), e mantidos em gaiolas apropriadas, em número máximo de 6 animais em cada uma delas. Os ratos receberam ração comercial balanceada própria e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos com controle circadiano e térmico adequados. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington, D.C. 1996), para uso de animais experimentais.

Todos os esforços foram realizados no sentido de se reduzir ao mínimo necessário o número de animais e o sofrimento dos mesmos. Para tanto, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional da Universidade Federal de Fortaleza, CE, Brasil (número de protocolo 70/11).

#### 2. *Punica granatum L.*

A PNG (Lote 22607) foi coletada no estado de São Paulo no Brasil e o extrato industrializado e padronizado foi adquirido junto a Farmácia e Laboratório Homeopático Farma Verde Ltda, Fortaleza, CE, Brasil. Foi obtido um extrato fluido da casca da planta secada ao sol. As análises microbiológicas foram realizadas após a produção do extrato. A PNG foi dissolvida em solução salina 0,9% e foi administrada por gavagem.

### **3. Laser de baixa intensidade Arseniato de Gálio e Alumínio**

Foi utilizado o aparelho de laser de baixa intensidade a base de arsênio-gálio-alumínio (AsGaAl) (Laser ECCO fibras e dispositivos; Campinas, SP, Brasil), com comprimento de onda 660 nm, intensidade óptica 100 mW e fluência 4 J/cm<sup>2</sup>. A ponteira utilizada possui 1,5 mm de diâmetro e as maxilas foram irradiadas durante 40 s na superfície vestibular do 2º molar superior esquerdo dos animais em um único ponto de contato. Essa dose foi baseada em estudo prévio de Garcia *et al.* (2010) o qual utilizou laser AsGaAl com comprimento de onda 660 nm, intensidade óptica 30 mW e área de contato 0,07 cm<sup>2</sup> durante 133 s por ponto (3 pontos na vestibular e 3 pontos na lingual do 1º molar inferior).

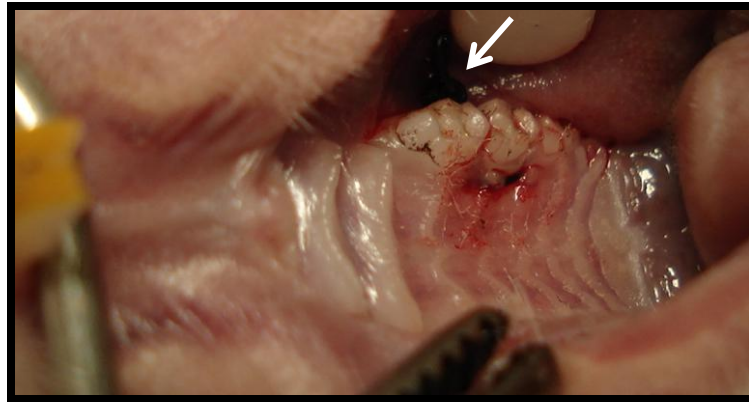
De fato, o protocolo utilizado no presente estudo difere quanto à aplicação ter sido realizada em apenas um ponto na superfície vestibular do 2º molar superior esquerdo, uma vez que essa é a área que apresenta maior perda óssea no modelo de periodontite utilizado. Quanto às variações na dose, tempo e área de aplicação, observa-se que tais parâmetros foram definidos de acordo com a variação do aparelho de laser, daí as diferenças entre o presente estudo e o estudo de Garcia *et al.* (2010).

## **4. Protocolo Experimental**

### **4.1. Modelo de Perda Óssea**

Foi utilizado o modelo de perda óssea descrito anteriormente (SALLAY *et al.*, 1982) e modificado por Lima *et al.* (2000, 2004) desenvolvido no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC. Esse consiste em inserir um fio de sutura de náilon 3.0, em torno do segundo molar superior esquerdo de um rato sob anestesia com Hidrato de Cloral (300 mg/kg-ip). Previamente à passagem do fio, uma guia foi utilizada nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado. Logo em seguida, o fio foi passado, de forma que o nó cirúrgico ficou voltado para a face vestibular da cavidade oral do rato (Figura 1).

Os animais foram mortos no 11<sup>o</sup> dia, dia de pico das lesões onde se observa intensa perda óssea (LIMA *et al.*, 2000, 2004).



**Figura 1: Fotografia ilustrando a indução da periodontite.** A periodontite foi induzida pela inserção do fio de náilon 3.0 em torno do 2<sup>o</sup> molar superior esquerdo. A seta indica o nó voltado para a face vestibular do dente citado (Arquivo do grupo).

#### **4.2. Grupos Experimentais:**

##### **A. Grupos controles**

Estes grupos foram constituídos por 6 ratos cada submetidos à periodontite experimental através da ligadura conforme descrito anteriormente. Os animais receberam solução salina a 0,9% (2 ml/kg - por gavagem), uma hora antes do procedimento cirúrgico e diariamente até o dia do sacrifício, no 11<sup>o</sup> dia pós-periodontite. Em um dos grupos, após a indução da periodontite, as hemimaxilas esquerdas foram irradiadas com laser de baixa intensidade Arseniato de Gálio-Alumínio na fluência de 4 J/cm<sup>2</sup> durante 40 s.

##### **B. Grupos tratados com *P. granatum***

Os animais constituíram três grupos de 6 ratos cada, os quais receberam, por gavagem, *P. granatum* nas doses de 60, 180 e 540 mg/kg respectivamente, uma hora antes da instalação do fio e após este, diariamente por um período de dez dias, sendo então, mortos. Durante o período experimental, o extrato fluido concentrado da casca da romã foi diluído em solução salina 0,9% diariamente para obtenção das doses de 60, 180 e 540

mg/kg. Para análise microscópica das hemiarcadas, dois grupos adicionais contendo cada um deles seis animais receberam solução salina a 0,9% (2 ml/kg; por gavagem) ou *P. granatum* 540 mg/kg por gavagem (dose que apresentou menor perda óssea alveolar), respectivamente. As doses utilizadas neste estudo foram baseadas em Huang *et al.*, 2005.

### **C. Grupo *P. granatum* (PNG) combinada com Laser de baixa intensidade Arsênio-Gálio-Alumínio (AsGaAl)**

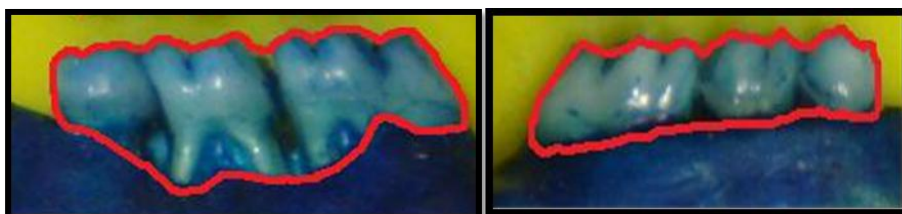
Este grupo foi constituído por 6 ratas submetidas à periodontite. Os animais receberam PNG na dose de 540 mg/kg por gavagem (dose que apresentou menor perda óssea), uma hora antes da instalação do fio e após este, diariamente por um período de dez dias, sendo então, mortos no décimo primeiro dia após a indução da periodontite. Após a indução da periodontite, as hemimaxilas esquerdas foram irradiadas com laser na fluência de 4 J/cm<sup>2</sup> durante 40 s.

## **4.3. Parâmetros avaliados na Doença Periodontal**

### **A. Estudo macroscópico**

No 11<sup>o</sup> dia após o procedimento cirúrgico, os animais foram mortos e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade (LIMA *et al.*, 2000, 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas com cera de abelha em lâminas para posterior registro fotográfico em câmera digital Sony Cyber-Shot<sup>®</sup> (modelo DSC-W170, Hong Kong, China). Para todas as tomadas fotográficas foi utilizada como referência uma área previamente conhecida para comparação (0,5 x 0,5 mm<sup>2</sup>). As imagens foram lançadas no Software Image J<sup>®</sup> (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Services Research Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland,

E.U.A.), para a quantificação da perda óssea alveolar (POA). A área de reabsorção considerada na hemiarcada corresponde à medida da área da ponta de cúspide vestibular até a borda óssea remanescente, subtraída da respectiva área na hemiarcada contralateral, utilizando como controle próprio do animal (GOES *et al.*, 2010). Essa área foi apresentada em (mm<sup>2</sup>).



**Figura 2: Fotografias de maxilas ilustrando desenho esquemático da mensuração da perda óssea alveolar na análise macroscópica.** Linha vermelha demarcando a área entre a ponta de cúspide vestibular até a borda óssea remanescente na hemiarcada esquerda (A) e na hemiarcada contralateral (B). Esta área obtida em pixels é comparada com a área conhecida do quadrado milimetrado, fotografado ao lado de cada hemiarcada (Arquivo do grupo).

## B. Análises microscópicas

As análises microscópicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada previamente processadas em parafina. Para tanto, 11 dias após a ligadura, os animais foram mortos. As hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas, e a seguir, foram submetidas à desmineralização com ácido fórmico 7% (Merck®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) por 20 dias. Em seguida, foram desidratadas, incluídas em parafina e cortes seriados de 4 µm foram realizados em micrótomo apropriado no plano mesio-distal dos molares. Por fim, as lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina (H&E), quando para histometria ou histologia, ou seguindo metodologia para imunomarcagem para TRAP (YAMAMOTO-SILVA *et al.*, 2013).

### B.1. Análise histométrica

A área de furca do segundo molar superior esquerdo foi considerada para avaliação histométrica. Após a exclusão do primeiro e último cortes, onde a região de furca estava evidente, um corte de cada bloco foi selecionado. Imagens foram obtidas dessa região em microscópio (x40) e lançadas em um programa de computador *Image J*<sup>®</sup> (*Image J* 1.44p, National Institute of Health; EUA) para análise da POA. A quantificação da POA na área de furca foi obtida a partir da obtenção da área realizadas entre uma linha passando na crista óssea e a superfície do dente (Figura 4). Todas as medidas foram realizadas por um mesmo examinador cego para o estudo (MARQUES *et al.*, 2005).



**Figura 4: Desenho esquemático da mensuração da perda óssea alveolar na análise histométrica.** Linha preta demarcando a área entre a superfície do dente e uma linha passando no ápice da crista óssea. (Arquivo próprio).

## B.2. Análise histológica

Para a análise histológica da hemiarcada, a região entre os 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molares foi considerada, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular e de osteoclastos, além do estado de

preservação do processo alveolar e do cimento, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 3, de acordo com a intensidade dos achados (LIMA *et al.*, 2000):

*Escore 0:* Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado.

*Escore 1:* Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado.

*Escore 2:* Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento.

*Escore 3:* Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento.

### **C. Marcação imunohistoquímica de TRAP**

Os cortes histológicos da maxila foram submetidos ao método da imunoperoxidase indireta empregando anticorpo policlonal para identificar a proteína tártaro-resistente à fosfatase ácida (TRAP).

Para isto, inicialmente os cortes histológicos foram coletados em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de alcoóis (100-70°). Estes foram lavados (3x5 minutos) em tampão fosfato de sódio (PB) 0.1M, pH 7,4, sob agitação lenta (25 rpm) e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos e lavados (5x5 minutos) com PBS.

Dando continuidade, os cortes histológicos foram incubados com solução contendo o anticorpo primário policlonal obtido em cabra anti-TRAP K17 de humano (sc30833, concentração de 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluído em PBS acrescido de soro normal de burro (017-000-001, Jackson ImmunoResearch laboratories, PA, USA), durante 24 horas a



temperatura ambiente, sob agitação. Os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS (5x5 minutos) e submetidos à segunda incubação com anticorpo secundário biotilado anti-cabra feito em burro (705-066-147, 1:200, *Jackson Immunoresearch laboratories*, PA, USA), diluído em PBS acrescido de soro normal de burro durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Os cortes histológicos foram novamente submetidos a lavagens em PBS (5x5 minutos) e incubados em estreptavidina conjugada com peroxidase (1:200, Kit ABC, PK6100, *Vector Laboratories*, CA, USA) diluído em solução de PB a temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada em solução de PBS acrescido com diambenzidina (0,005%), seguido de inativação através de inúmeras lavagens em PBS.

Estes cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem hidrofóbico (Erv-mount, Erviegas, SP, Brasil).

Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão do anticorpo primário ou secundário, seguido dos demais procedimentos citados anteriormente.

Secções de quatro  $\mu\text{m}$  de espessura, correspondente à área entre o primeiro e segundo molares foram avaliadas por microscopia de luz. A área de coloração imuno-histoquímica para TRAP foi calculada através do desenho de uma linha em torno das regiões coradas com marrom (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2006). A imagem adquirida foi enviada para um programa de computador *Image J*® (*Image J* 1.44p, Instituto Nacional de Saúde; EUA) para análise da coloração imuno-histoquímica de TRAP. Os cortes foram feitos por um único examinador cego.

#### **D. Dosagem da mieloperoxidase**

No 11º dia experimental, tecidos gengivais subjacentes à área desafiada foram removidos de animais submetidos à ligadura e cujos espécimes

seguiriam apenas à macroscopia, mantidos a -20 °C em freezer e posteriormente homogeneizados e processados para a análise da atividade da mieloperoxidase, enzima abundante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Essa enzima tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos ativos nos processos inflamatórios em vários tecidos, e seguimos protocolo baseado em metodologia descrita por Bradley *et al.* (1982) (LIMA *et al.*, 2005). Para tanto, cada 50 mg de tecido gengival foram colocados em um tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em tubos tipo Eppendorf sob refrigeração. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4 °C, e o sobrenadante colhido. A atividade da MPO foi aferida, 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  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22 °C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado ocorreu 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/g de tecido (BRADLEY *et al.*, 1982; LIMA *et al.*, 2005).

#### **4.4. Análise dos parâmetros sistêmicos:**

##### **A. Avaliação da Fosfatase Alcalina Óssea**

Para a dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), parte das amostras de sangue foi utilizada para a dosagem de Fosfatase Alcalina Total (FAT) dos animais e avaliada através da determinação da atividade sérica dessa enzima. A quantificação foi feita utilizando-se “Kit” específico, cuja metodologia a ser seguida foi conforme orientação do laboratório fabricante (Labtest<sup>®</sup>). Para a dosagem dos níveis séricos da enzima Fosfatase Alcalina Total (FAT), que compreende as isoformas entérica, hepática e óssea, foi utilizado “Kit” específico, cuja metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (Labtest<sup>®</sup>). Em todos os tubos de ensaio, previamente identificados como Branco, Amostra e Padrão, foram adicionados 250  $\mu$ l e 25  $\mu$ l do tampão e do substrato, respectivamente. A seguir, 25  $\mu$ l da substância correspondente ao padrão foram adicionados aos tubos identificados como padrão apenas. Todos

os tubos foram submetidos ao aquecimento indireto a 37 °C em banho-maria, durante 2 minutos. Logo após, 25 µl da amostra coletada de cada animal foram adicionados aos tubos correspondentes a amostra e, em seguida, foram homogeneizados. Com isso, todos os tubos foram submetidos a outro aquecimento em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O reagente de cor foi, então, adicionado na quantidade de 1 ml em todos os tubos para que, posteriormente, fossem efetuadas as leituras por espectrofotometria em 590 nm, corrigindo-se o zero com o branco.

Posteriormente, uma alíquota da amostra sérica 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 µl da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente por espectrofotometria a 30 °C com leitura das absorvâncias em 405 nm, tendo como substrato o *p*-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975).

## **B. Análise da função hepática**

No 11° dia foram coletadas amostras de sangue por meio de plexo orbital e as alterações hepáticas dos animais foram investigadas através da determinação da atividade sérica das enzimas transaminases hepáticas (AST e ALT). A quantificação foi realizada utilizando-se “Kits” específicos para cada tipo de dosagem. A metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (Labtest®). Para tanto, alíquotas de 50 µl da amostra foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos para AST, ou 30 minutos para ALT. Em seguida foram adicionados 250 µl do reagente de cor e 2,5 ml de solução NaOH. Posteriormente foi determinada diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorvâncias utilizando comprimento de onda de 505 nm.

### **C. Análise da função renal**

No 11º dia foram coletadas amostras de sangue por meio de plexo orbital e as alterações renais dos animais foram investigadas através da determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina. A quantificação foi realizada utilizando-se “Kits” específicos para cada tipo de dosagem. A metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (Labtest®). Para determinação dos níveis séricos de ureia, alíquotas de 10 µl da amostra foram adicionadas a 1 ml de urease tamponada e incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 1 ml da solução oxidante, posteriormente foi determinada diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 600 nm. Para determinação dos níveis séricos de creatinina, alíquotas de 125 µl da amostra foram adicionadas a 250 µl de ácido pícrico e 1 ml de solução tampão. Em seguida, foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse período foi realizada uma primeira leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm. Em seguida foi adicionado 50 µl de solução acidificante para a realização de uma nova leitura das absorbâncias.

### **D. Índices hepático e renal e Variação de massa corpórea**

No 11º dia, o fígado e o rim esquerdo dos animais foram removidos e pesados. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão, quando o peso úmido de cada órgão foi dividido pelo peso do animal no dia do sacrifício.

### **E. Estudos hematológicos**

A anestesia dos animais foi realizada utilizando-se Hidrato de Cloral (300 mg/kg; i.p.). Em seguida, seccionou-se a ponta da cauda do animal com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e a seguinte, colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método H&E, para as contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de

Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Logo após, os animais tiveram suas caudas cauterizadas, para evitar eventuais infecções. Os hemogramas foram realizados imediatamente antes da ligadura e no 11<sup>o</sup> dia.

#### **4.5. Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou mediana seguida de seus valores extremos, quando apropriado. Para comparação das médias foi usado o teste de Análise de variância (Anova) seguido pelos testes de Bonferroni ou teste t de Student e para comparação das medianas foram usados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Em todas as ocasiões foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$  e o programa utilizado foi o GraphPad Prism 5 software (GraphPad Prism<sup>™</sup>, Inc., San Diego, CA, USA).

## 8 ANEXO

### DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 70/2011, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA *Punica granatum* NA PERIODONTITE INDUZIDA POR CORPO ESTRANHO EM RATOS**”, de responsabilidade de Vilma de Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 30 de agosto de 2011.

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