



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ERIKA VANESSA FARIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VIVO* DE UM TRITERPENOS SEMISSINTÉTICO (CL-P2) E ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DE UM HIDROGEL DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE CL-P2 NO MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGAS *SWISS*.

SOBRAL

2024

ERIKA VANESSA FARIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VIVO* DE UM TRITERPENÓ SEMISSINTÉTICO (CL-P2)
E ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DE UM HIDROGEL DE SISTEMA DE
LIBERAÇÃO DE CL-P2 NO MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGAS
SWISS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Metabolismo Ósseo

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Jordânia Marques Freire.

SOBRAL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- S234a Santos, Erika Vanessa Farias dos.
ANÁLISE DA TOXICIDADE IN VIVO DE UM TRITERPENO SEMISSINTÉTICO (CL-P2) E ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DE UM HIDROGEL DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE CL-P2 NO MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGAS SWISS. / Erika Vanessa Farias dos Santos. – 2024.
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner.
Coorientação: Profa. Dra. Jordânia Marques Freire.
1. Combretum leprosum. 2. Periodontite. 3. Perda Óssea. 4. Folículos ovarianos. I. Título.

CDD 610

ERIKA VANESSA FARIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VIVO* DE UM TRITERPENOS SEMISSINTÉTICO (CL-P2)
E ATIVIDADE ANTIRREABSORPTIVA DE UM HIDROGEL DE SISTEMA DE
LIBERAÇÃO DE CL-P2 NO MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGAS
SWISS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Metabolismo Ósseo.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Mirna Marques Bezerra Brayner (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

Prof.^a Dr.^a. Hellíada Vasconcelos Chaves (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

À minha mãe (*In memoriam*), Elza de Farias.

Ao meu amor, Samya Souza Bem, por me
manter firme até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor incondicional e pela sua infinita misericórdia, me mantendo de pé diante do momento mais difícil da minha vida (saudades minha mãe) e me permitindo chegar até aqui, que inúmeras vezes acreditei que não conseguiria.

Aos meus pais, Elza de Farias (*in memoriam*) e Antônio Natal, que desde cedo me ensinaram a percorrer o caminho das pedras sem desacreditar que cada sonho meu pudesse se tornar real, e por todo amor que dedicaram a mim, eu amo vocês.

Ao meu amor, Sâmya, que foi meu alicerce diante de tanta provação, e que nunca me deixou desistir, e foram muitas as vezes que pensei em parar, pois o fardo estava pesado, eu te amo, amor, quero uma vida com você.

Ao meu irmão, João Victor, que nos últimos anos Deus o fez se aproximar de mim, fazendo total diferença nos meus dias, obrigada por nunca soltar minha mão.

Aos amigos (de verdade), que genuinamente torceram por mim, que enxugaram minhas lágrimas, que colocaram a mão no meu queixo e levantaram a minha cabeça, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Mirna Marques, por cada segundo de dedicação ao me ensinar e literalmente pegar na minha mão e me guiar numa linha de pesquisa extremamente desafiadora para mim, jamais esquecerei das sextas-feiras de orientação onde não só aprendia sobre metabolismo ósseo, mas também sobre a vida, sobre conduta e sobre fé. Minha eterna gratidão, Professora. Que Deus a abençoe cada dia mais.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Jordânia Freire, que sem sombra de dúvidas foi um dos melhores presentes que o mestrado me deu. Profa, você foi escuta ativa quando tudo parecia desabar, quando nada estava dando certo, e foi aquela que sempre me reergueu a cada caminho difícil e cansativo da minha pesquisa.

Ao, Prof. Dr. Anderson Weyni, que foi a pessoa que dentro da pesquisa, mais me incentivou, e que me ensina todo santo dia sobre humanidade, empatia e respeito ao próximo, você é referência pra mim. Finalizo esse mestrado e a maior lição que aprendi veio de você: *sejamos responsáveis por fortalecer pessoas*. Você não faz ideia do quanto isso me salvou, minha eterna gratidão por tudo.

À Prof.^a Dra. Hellíada Chaves, minha eterna gratidão e admiração por tanta garra e perspicácia, obrigada por ter me estendido a mão quando eu era uma IC que não tinha bagagem científica nenhuma, mas você acreditou e credibilizou minha força de vontade.

A todos os colaboradores, técnicos e funcionários da UFC, aos IC's, mestrandos e

doutorandos por todo suporte, sozinho ninguém faz ciência, vocês foram peças fundamentais.

À UFC, pela oportunidade de aprender tanto no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, e pelas lições que aprendi nos corredores e laboratórios, finalizo esse ciclo na certeza de uma Erika mais forte, persistente e coerente com meus princípios e valores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por possibilitar a conclusão do mestrado em um programa de excelência, e à Instituição de Fomento à Pesquisa FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

“Sejamos responsáveis por fortalecer pessoas”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Combretum leprosum* é uma espécie popularmente utilizada no Brasil como agente anti-inflamatório. Estudos fitoquímicos no gênero *Combretum* demonstraram a presença de diversas classes de compostos bioativos, entre eles o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -triidroxilup-20(29)-eno (CL-1). **OBJETIVO:** Avaliar a toxicidade *in vivo* do composto CL-P2, um triterpeno semissintético obtido a partir do CL-1, e a atividade antirreabsortiva de um hidrogel de sistema de liberação de CL-P2 no modelo de periodontite em camundongas *Swiss*. O projeto foi aprovado pela CEUA-UFC Sobral (01/20). **MÉTODOS:** Os ensaios de toxicidade foram realizados através do protocolo de Toxicidade Oral (OECD no 425). Para isso, foram usadas camundongas *Swiss* fêmeas (n=10) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os grupos experimentais incluíram: Controle (salina) e tratamento com CL-P2 (175, 550 e 2000 mg/kg). Foram avaliados parâmetros comportamentais durante 14 dias. No 15º dia após a eutanásia foi coletado sangue para análise dos níveis de ácido úrico, creatinina, ALT e AST. Foram coletados órgãos para análise histopatológica (H&E). Para o ensaio de periodontite, foram utilizados 48 camundongas *Swiss* fêmeas. A periodontite foi induzida por fio algodão (5.0) nos primeiros molares inferiores. Os grupos incluíram: naive; periodontite+hidrogel veículo; periodontite+hidrogel CL-P2 (1 ou 10mg), aplicado 2x/d/14d. No 15º dia, os animais foram eutanasiados e as hemiarquadas coletadas para análises morfométrica e histométrica (software ImageJ®) do osso alveolar. Foi coletado sangue periférico para dosagem de Fosfatase alcalina óssea (FAO). Ainda, foram coletados os ovários para analisar a segurança pré-clínica do hidrogel CL-P2 sobre a saúde reprodutiva. Para a análise estatística foram usados: teste de Shapiro-Wilk e ANOVA (Tukey), considerando $p < 0,05$ como significativo. **RESULTADOS:** Não foi observada mortalidade durante os 14 dias do teste. Na análise comportamental, observou-se aumento do número de lambidas e sonolência no início do tratamento com CL-P2, sem alterações significativas nos outros parâmetros, assim como no peso corporal, funções hepática e renal e sistema reprodutor. O Hidrogel com CL-P2 10 mg/kg reduziu a perda óssea alveolar com aumento dos níveis de FAO. O uso do hidrogel não impactou negativamente a sobrevivência e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, sugerindo a segurança do composto sobre a saúde reprodutiva das camundongas. **CONCLUSÃO:** CL-P2 pode representar um produto com potencial biotecnológico para a produção de um novo fármaco antirreabsortivo.

Palavras-chave: *Combretum leprosum*; Periodontite; Perda Óssea; Folículos ovarianos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Combretum leprosum* is a species popularly used in Brazil as an anti-inflammatory agent. Phytochemical studies in the genus *Combretum* have demonstrated the presence of several classes of bioactive compounds, including the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxylup-20(29)-ene (CL-1). **OBJECTIVE:** To evaluate the in vivo toxicity of the compound CL-P2, a semisynthetic triterpene obtained from CL-1, and the antiresorptive activity of a CL-P2 delivery system hydrogel in the periodontitis model in Swiss mice. The project was approved by CEUA-UFC Sobral (01/20). **METHODS:** Toxicity tests were performed using the Oral Toxicity protocol (OECD no. 425). For this, female Swiss mice (n=10) from the Central Bioterium of the Federal University of Ceará were used. The experimental groups included: Control (saline) and treatment with CL-P2 (175, 550 and 2000 mg/kg). Behavioral parameters were evaluated for 14 days. On the 15th day after euthanasia, blood was collected for analysis of uric acid, creatinine, ALT and AST levels. Organs were collected for histopathological analysis (H&E). Forty-eight female Swiss mice were used for the periodontitis assay. Periodontitis was induced by cotton thread (5.0) in the first lower molars. The groups included: naïve; periodontitis+vehicle hydrogel; periodontitis+CL-P2 hydrogel (1 or 10mg), applied 2x/d/14d. On the 15th day, the animals were euthanized and the hemiarches were collected for morphometric and histometric analyses (ImageJ® software) of the alveolar bone. Peripheral blood was collected for measurement of bone alkaline phosphatase (BAP). Ovaries were also collected to analyze the preclinical safety of the CL-P2 hydrogel on reproductive health. The Shapiro-Wilk test and ANOVA (Tukey) were used for statistical analysis, considering $p < 0.05$ as significant. **RESULTS:** No mortality was observed during the 14 days of the test. In the behavioral analysis, an increase in the number of licks and drowsiness was observed at the beginning of treatment with CL-P2, with no significant changes in other parameters, such as body weight, liver and kidney functions and reproductive system. The hydrogel with CL-P2 10 mg/kg reduced alveolar bone loss with increased BAP levels. The use of the hydrogel did not negatively impact the survival and development of ovarian follicles, suggesting the safety of the compound on the reproductive health of mice. **CONCLUSION:** CL-P2 may represent a product with biotechnological potential for the production of a new antiresorptive drug.

Keywords: *Combretum leprosum*; Periodontitis; Bone loss; Ovarian follicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Aspectos gerais de <i>C. leprosum</i>	14
Figura 2 –	Homeostase versus Inflamação na Saúde Oral e Periodontite.....	24
Figura 3 -	<i>Combretum leprosum</i> (Mofumbo) em local de coleta	27
Figura 4 -	Taxa de sobrevivência dos animais no ensaio de segurança de CL-P2.....	42
Figura 5 –	Efeito do hidrogel de CL-P2 na perda óssea alveolar e nos níveis de Fosfatase Alcalina Óssea	44
Figura 6 -	Efeito do hidrogel de CL-P2 na área da furca.....	46
Figura 7 -	Efeito do hidrogel de CL-P2 no nível de inserção.....	47
Figura 8 –	Imagens e gráfico representando a morfologia e os percentuais de folículos morfologicamente normais	48
Figura 9 -	Incidência de folículos primordiais e em desenvolvimento.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança e toxicidade aguda de CL-P2 na dose única de 2000 µg/Kg.	42
Tabela 2 -	Efeito CL-P2 sobre o peso (g) de camundongos fêmeas (<i>Swiss</i>) em estudo de toxicidade segundo protocolo OECD 425.	43
Tabela 3 -	Efeito CL-P2 sobre os níveis séricos de creatinina, ALT e AST de camundongos fêmeas (<i>Swiss</i>) em estudo de toxicidade segundo protocolo OECD 425.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Enzima Alanina Aminotransferase
AST	Enzima Aspartato Aminotransferase
BALP	<i>Bone Alkaline Phosphatase</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais,
CLF-1	Trihidroxilup-20(29)-eno
CL-P2	Triterpeno Semissintético
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação em Animais
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
H&E	Hematoxilina-Eosina
JCE	Junção Cimento-Esmalte
LABFITO	Laboratório de Fitoquímica Aplicada
LAFS	Laboratório de Farmacologia de Sobral
MMP	metaloproteinases
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PE	Periodontite Experimental
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	<i>Combretum leprosum</i> Mart com potencial para desenvolvimento de fármacos....	13
1.2	Triterpenos e saúde óssea	15
1.3	Periodontite	15
1.4	Modelos experimentais no estudo da periodontite.	16
1.5	Hidrogéis como Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.	17
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	CAPÍTULOS	Erro! Indicador não definido.
4.1	ARTIGO 1: Triterpenos e saúde óssea: potencial terapêutico de <i>combretum leprosum</i> mart. na periodontite.....	22
4.2	ARTIGO 2 - Análise da toxicidade e atividade antirreabsortiva de hidrogel de sistema de liberação de um triterpeno semissintético (cl-p2) em camundongas swiss.....	Erro! Indicador não definido.
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA	59
	ANEXO B – DECLARAÇÃO DE ACEITE CAPÍTULO DE LIVRO	60

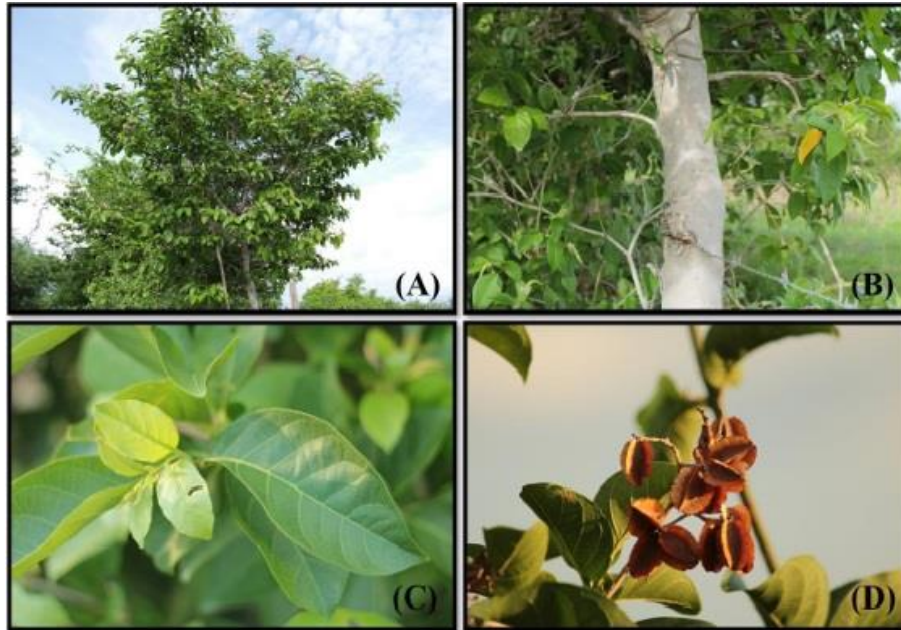
1 INTRODUÇÃO

1.1 *Combretum leprosum* Mart com potencial para desenvolvimento de fármacos

Os medicamentos à base de plantas têm desempenhado um papel crescente e relevante à nível global no tratamento de diversas doenças, impulsionando a busca por novas substâncias bioativas. Destacam-se entre as famílias de plantas estudadas aquelas do gênero *Combretum*. A família Combretaceae, consiste de 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum* possuindo aproximadamente 370 espécies. O gênero *Combretum* (Combretaceae) apresenta cerca de 10% de suas espécies citadas na literatura com uso etnofarmacológico principalmente no tratamento de doenças como câncer, lepra, febres tropicais e cólicas (Breytenbac; Malan, 1989). *Combretum leprosum* é uma espécie encontrada nos estados do norte e nordeste brasileiros (Marinho *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2007). As espécies desse gênero apresentam inúmeros metabólitos secundários como taninos, saponinas, flavonóides, cumarinas, alcaloides, di e triterpenos, dentre outros (Lima *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2015). Conhecida popularmente pelo nome de mofumbo, a espécie é utilizada como planta medicinal com função cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, como sedativo (Petrovski *et al.*, 2006), antitussígeno e expectorante (Agra *et al.*, 2007).

Conforme descrito por Ferreira *et al.* (1995), *Combretum leprosum* pode apresentar porte arbóreo ou arbustivo, alcançando alturas entre 2 e 8 metros (Figura 1A). Seu caule é cilíndrico, com contorno circular e superfície brilhante, de coloração acinzentada (Figura 1B). As folhas são simples, opostas, de formato oval com ápice acuminado, e apresentam escamas esbranquiçadas em ambas as faces, sem a presença de domácias (Figura 1C). A planta possui flores de coloração amarela e frutos do tipo drupa, de formato elíptico ou subelíptico, com quatro asas, medindo entre 21,8 a 22 mm de comprimento e 14 a 15 mm de largura (Figura 1D).

Figura 1 – Aspectos gerais de *C. leprosum*.



Fonte: Almeida-Bezerra, J.W. (2022).

Estudos fitoquímicos realizados em espécies do gênero *Combretum* identificaram diversas classes de compostos químicos bioativos, incluindo o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (CLF-1). A literatura ressalta o amplo potencial farmacológico do CLF-1, evidenciando sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antiparasitária, analgésica, cicatrizante e antibacteriana, além de seu efeito antitumoral. (Alcântara *et al.*, 2022). Viau *et al.* (2014) relataram que *C. leprosum* é rico em metabólitos secundários incluindo cicloartanos, flavonóides (3-O metilquercetina, 5,3 β -dihidroxi -3,7,4 β trimetoxiflavona, 5,3 β ,4 β -trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona e quercetina) e triterpenos (ácido arjunólico, ácido mólico e $3\beta,6\beta,16\beta$ trihidroxi-lup-20(29)-eno).

Os triterpenos desempenham um papel importante como compostos de sinalização e reguladores de crescimento em plantas (Singh *et al.*, 2023). A identificação, isolamento e caracterização dos reservatórios fitoquímicos presentes em plantas medicinais pode contribuir no desenvolvimento de novos fármacos, complementando drogas sintéticas com alternativas naturais (Chihomvu *et al.*, 2024). Nesse sentido, a partir do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (CL-1) das flores de *C. leprosum* nosso grupo de pesquisa produziu um triterpeno semissintético: $3\beta,6\beta,16\beta$ -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) que demonstrou a ausência de toxicidade para CL-P2 em fibroblastos murinos (L929) e em queratinócitos humanos (HaCaT), além de atividade antinociceptiva em camundongos (Patente número:

BR10202000346 – DOC. 01). Além das atividades já demonstradas com relação ao *C. leprosum* os triterpenos também parecem exercer atividade sobre o metabolismo ósseo.

1.2 Triterpenos e saúde óssea

Produtos naturais têm sido usados há muito tempo tradicionalmente para prevenir e curar a perda óssea. Atenção tem sido focada nos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais. Nesse sentido, dados da literatura sugerem que os triterpenos podem modular o metabolismo ósseo (Porwal *et al.*, 2017)

De fato, no estudo de Im *et al.*, (2016), demonstrou que os compostos bioativos presentes no *Combretum leprosum*, especialmente os triterpenos, possuem propriedades que podem inibir a reabsorção óssea. Foi observado que o triterpeno inibiu significativamente a diferenciação dos osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea através dos seus efeitos sobre as MAP quinases e os fatores de transcrição (NF- κ B, NFATc1 e c-Fos) advindos do recetor RANK do fator de diferenciação dos osteoclastos. A reabsorção óssea é um processo característico de doenças como a osteoporose e a periodontite. A eficácia antirreabsortiva está ligada à capacidade dos triterpenos de modularem a atividade dos osteoclastos, células responsáveis pela degradação óssea (IM *et al.*, 2016).

Assim, entender as possíveis conexões entre triterpenos e saúde óssea abririam caminhos para novos tratamentos de doenças inflamatórias ósseas, incluindo osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite e periodontite.

1.3 Periodontite

Dentre as doenças que afetam o metabolismo osseo, a periodontite é uma doença imuno-inflamatória, cuja patogênese envolve a resposta do hospedeiro a um biofilme disbiótico, e se não tratada, leva à destruição progressiva do osso alveolar e eventual perda dentária, comprometendo a mastigação e a estética e afetando a qualidade de vida (Peres *et al.*, 2019).

Em sua forma mais grave, a periodontite é a sexta condição mais prevalente no mundo, e entre 2011 e 2020, a periodontite em adultos dentados foi estimada em cerca de 62%; e periodontite severa em 23,6% (Trindade *et al.*, 2023). Nas últimas cinco décadas, houve um avanço substancial na compreensão das causas e mecanismos envolvidos na etiologia e patogênese da periodontite, bem como nas suas interações com o organismo hospedeiro. Esse conhecimento aprimorado evidenciou o impacto das condições periodontais sobre a homeostase,

o que impulsionou a realização de estudos que correlacionam a periodontite com diversas doenças e condições sistêmicas. O termo Medicina Periodontal descreve como a infecção/inflamação periodontal pode afetar a saúde extraoral (Fischer et al., 2021). De fato, a periodontite além de afetar os tecidos de sustentação dos dentes, é também fator de risco para diversas doenças (Srivastava et al., 2022). Estudos destacam a importância da saúde bucal em condições sistêmicas, incluindo anormalidades relacionadas aos sistemas cardiovascular, respiratório, musculoesquelético e reprodutivo (Liccardo et al., 2019; XU et al., 2020). Neste sentido, alguns autores mostraram que a saúde bucal pode afetar a fertilidade nas mulheres (Ricci et al., 2022). A periodontite está associada a fatores de risco conhecidos para a infertilidade feminina, como idade, obesidade e doença renal crônica (Machado et al., 2020).

Percepções derivadas principalmente de estudos em ensaios pré-clínicos, sugerem que a periodontite é um fator de risco modificável para comorbidades, uma noção que é apoiada por estudos clínicos de intervenção, que mostraram que o tratamento da periodontite atenua a inflamação sistêmica e marcadores de comorbidades (Kaneoka et al., 2015). Assim, terapias adjuvantes que contribuam para melhorar o status periodontal adquirem importância crescente, pois poderiam ajudar a reduzir o risco de ocorrência de comorbidades extra-orais, tais como os achados do estudo de Hajishengallis e Chavakis (2021), que revisaram os mecanismos locais e sistêmicos que ligam a doença periodontal a comorbidades inflamatórias, e mostraram que a inflamação periodontal pode contribuir para a disfunção ovariana através de mecanismos inflamatórios sistêmicos. Por exemplo, a inflamação crônica pode levar à resistência à insulina, uma condição frequentemente associada à SOP (Síndrome do Ovário Policístico), e impactar negativamente a saúde reprodutiva.

1.4 Modelos experimentais no estudo da periodontite.

Modelos animais para estudo da periodontite podem ser estabelecidos em diferentes espécies, como ratos, camundongos, cães, porcos e primatas não-humanos. Em comparação aos animais de grande porte, como os cães, porcos e primatas não-humanos, os de pequeno porte, como ratos e camundongos, apresentam vantagens, dentre elas: fácil manuseio, menor custo, melhor adaptabilidade ambiental e alta capacidade reprodutiva. Essas características facilitam a realização de experimento, reduzindo o custo e possibilitando que o estudo seja executado com um número relativamente grande de animais experimentais (Zhang et al., 2023).

Modelos murinos têm sido utilizados no estudo experimental da periodontite (Bezerra et al., 2000; Melo et al., 2023; ABE; Hajishengallis, 2013), visto que permitem

examinar diversas hipóteses biológicas relacionadas à patogênese da doença, interações hospedeiro-bactéria e abordagens terapêuticas, sendo capazes de, pelo menos em parte, reproduzir finamente os aspectos clínicos, moleculares, e características histológicas da periodontite humana. A periodontite experimental em camundongos pode ser induzida de diferentes modos, como gavagem oral, inoculação periodontal de bactérias associadas à doença periodontal, quimicamente ou por ligadura (Rojas *et al.*, 2021).

O método por ligadura é atualmente considerado um dos modelos mais utilizados em pesquisas periodontais (De Souza Malta *et al.*, 2019). Um fio de algodão, seda ou nylon é colocado na área cervical dos molares maxilares ou mandibulares de ratos e/ou camundongos para induzir um grande acúmulo de placa e ulceração do epitélio do sulco. A placa aderida sobre o fio facilita a invasão para o tecido conjuntivo e leva a alterações no tecido periodontal similares às observadas em periodontites humanas, como ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias e perda das fibras do ligamento periodontal e destruição óssea (Klausen, 1991).

Em ratos livres de microrganismos, a colocação de ligaduras não induz a uma significativa inflamação gengival ou perda óssea (Rovin; Costich; Gordon, 1966), igualmente como a utilização de antimicrobianos reduz a perda de inserção e a reabsorção óssea, confirmando o papel das bactérias no início e na progressão da destruição tecidual nestes modelos (Kenworthy; Baverel, 1981). Seguindo este raciocínio, porém visando uma indução mais rápida e evidente da doença periodontal, alguns pesquisadores optam pela colocação de ligaduras embebidas em bactérias periodonto patogênicas. Em ratos, a perda dos tecidos de inserção e perda óssea ocorre previsivelmente em um período de sete dias (Bezerra *et al.*, 2002).

Embora a raspagem e alisamento coronorradicular seja considerado o método mais eficaz no tratamento da periodontite, nem todos os pacientes se beneficiam dessa técnica, estimulando a pesquisa básica e clínica por tratamentos complementares. Na tentativa de proporcionar melhorias clínicas aos pacientes com menos efeitos colaterais o interesse tem sido maior na busca por terapias de uso localizado como os hidrogéis.

1.5 Hidrogéis como Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.

A terapia padrão da periodontite (raspagem e alisamento radicular) muitas vezes com abordagens antimicrobianas adjuvantes nem sempre é eficaz, especialmente em pacientes altamente suscetíveis tornando o tratamento da periodontite um desafio clínico (Peres *et al.*, 2019). Dessa forma, há uma necessidade de desenvolver terapias adjuvantes que possam

fornecer liberação controlada e sustentada de agentes terapêuticos diretamente no local afetado. Alguns autores demonstraram o potencial terapêutico de uma variedade de produtos obtidos de plantas no manejo da periodontite. Dentre os compostos obtidos de plantas os triterpenos também parecem exercer efeito anti-inflamatório na periodontite (Pinto et al., 2007.)

O desenvolvimento de novos tratamentos para a periodontite pode ser beneficiado pelo uso de hidrogéis como sistemas de liberação controlada de fármacos. Estudos têm demonstrado que hidrogéis injetáveis e termossensíveis, como os preparados com quitosana, β -fosfato de sódio e gelatina, são eficazes na regeneração periodontal e na liberação contínua de aspirina e eritropoetina, proporcionando efeitos anti-inflamatórios e de regeneração tecidual (Xu et al., 2019). Além disso, hidrogéis reforçados com nanoenzimas de MnO₂ e modificados com catecol mostraram capacidade antioxidante e antibacteriana melhorada, oferecendo uma solução promissora para o tratamento da periodontite (Hu et al., 2023).

Devido à sua estrutura porosa e capacidade de absorção de água, os hidrogéis são capazes de encapsular e fornecer agentes bioativos, como compostos antibacterianos e anti-inflamatórios, de maneira controlada e sustentada. Essa estrutura não só proporciona um ambiente favorável ao crescimento celular e regeneração tecidual, mas também é valiosa na medicina regenerativa. Os hidrogéis podem servir como suportes estruturais que promovem a adesão, proliferação e diferenciação celular. A capacidade de controlar a liberação de agentes bioativos posiciona os hidrogéis como ferramentas promissoras para intervenções terapêuticas inovadoras, especialmente no tratamento de condições complexas como a periodontite (Yin *et al.*, 2023). Além dos inúmeros benefícios mencionados da terapia com hidrogéis, eles também se destacam por atuarem como veículos para agentes antibacterianos e por superarem os desafios de resistência a antibióticos observados nas terapias convencionais. (Mensah et al., 2023).

Destarte, considerando o potencial terapêutico de *C. leprosum* e os impactos orais e extra-orais da periodontite, este estudo tem como objetivo avaliar a eficácia e toxicidade de CL-P2 em um ensaio de periodontite em camundongos Swiss fêmeas administrado num sistema de liberação local na forma de um hidrogel. Investigaremos também o possível efeito dessa terapia na sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos.

2 JUSTIFICATIVA

A periodontite, além de afetar os tecidos de sustentação dos dentes e ser a principal causa de perda dentária em adultos, é também fator de risco para diversas doenças sistêmicas (Srivastava et al., 2022). Nos últimos anos, houve um progresso considerável na compreensão da etiopatogenia da periodontite em suas várias formas e suas interações com o hospedeiro. Estudos destacam a importância da saúde bucal em condições sistêmicas, incluindo anormalidades relacionadas aos sistemas cardiovascular, respiratório, musculoesquelético e reprodutivo (Liccardo et al., 2019; Xu et al., 2020). No entanto, apesar de sua grande prevalência, a compreensão da fisiopatologia dos eventos imune-inflamatórios que determinam a lise óssea, a característica mais danosa da periodontite, ainda representa um grande desafio. Diante desse cenário, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas poderá beneficiar tanto os pacientes quanto os profissionais de saúde, proporcionando opções de tratamento mais eficazes e direcionadas.

Neste estudo, o composto semissintético derivado de *Combretum leprosum* foi usado para desenvolver um hidrogel que pode representar uma opção terapêutica local eficaz para o tratamento da lise óssea inflamatória, contribuindo para avanços na terapêutica da periodontite.

Assim, a produção de um derivado semi-sintético a partir de uma planta já utilizada pela comunidade reforça o potencial inovador do presente estudo para geração de tecnologias estratégicas, uma vez que a prospecção de novos medicamentos a partir de plantas já usadas medicinalmente pelas comunidades poderá contribuir para o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional, consolidação do SUS e empoderamento da sociedade, considerando o alto impacto que o setor farmacêutico tem sobre a sociedade como um todo, principalmente na saúde da população, além de ser um setor economicamente estratégico, pois um investimento realizado nessa área acaba por impactar outros setores da economia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade, a atividade antirreabsortiva e a proteção folicular ovariana de um hidrogel de sistema de liberação de um triterpeno semissintético (CL-P2) em camundongas Swiss.

3.2 Objetivos específicos:

1. Realizar o teste de toxicidade aguda do derivado semissintético CL-P2, utilizando protocolo experimental OECD 425;
2. Analisar a eficácia antirreabsortiva do hidrogel de CL-P2 no modelo de periodontite sobre os seguintes parâmetros:
 - ✓ perda óssea alveolar através da análise morfométrica e histométrica (software ImageJ®);
 - ✓ Dosagem dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO).
3. Analisar a segurança pré-clínica do hidrogel CL-P2 sobre a sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos de camundongas.

4 CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 45 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertação de mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (Anexo A). Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, os protocolos utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação e foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal, com protocolo 01/20 (Anexo B).

Assim, essa dissertação de mestrado é composta por dois capítulos, a saber:

4.1 CAPÍTULO 1:

CAPÍTULO DE LIVRO: “Triterpenos e saúde óssea: potencial terapêutico de *Combretum leprosum* Mart. na periodontite”.

Autores: Erika Vanessa Farias dos Santos, Mirna Marques Bezerra Brayner, Jordânia Marques Freire, Anderson Weiny Barbalho Silva, Hellíada Vasconcelos Chaves, Alana Godinho, Jair Mafezoli, Francisco Geraldo Barboza, José Roberto Viana Silva.

Submetido para publicação no livro eletrônico: “*Health research: current challenges and future perspectives 4*” a ser publicado em Setembro 2024 (Editora Atena).

4.2 CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Análise da toxicidade *in vivo* de um triterpeno semissintético (CL-P2) e atividade antirreabsortiva de um hidrogel de sistema de liberação de CL-P2 no modelo de periodontite em camundongos *Swiss*.

Esse artigo será submetido ao periódico: BRAZILIAN JOURNAL OF HEALTH REVIEW ISSN 2595-6825 – Qualis B3 (Medicina I e II).

Capítulo 1

Triterpenos e saúde óssea: potencial terapêutico de *Combretum leprosum* Mart. na periodontite

Erika Vanessa Farias dos Santos ^a; Jordânia Marques de Oliveira Freire ^a; Anderson Weiny Barbalho Silva ^b; Hellíada Vasconcelos Chaves ^c; Francisco Geraldo Barbosa ^e; Jair Mafezoli ^e; Alana Godinho; Mirna Marques Bezerra Brayner ^{d*}

a - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (erikafarias7@outlook.com; jordaniafreire25@gmail.com)

b - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.(andersonweiny@sobral.ufc.br)

c - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (helliadachaves@yahoo.com.br)

d - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (mirnabrayner@gmail.com)

e - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará – campus Pici. Rua Delmiro de Farias, s/n - Rodolfo Teófilo, CEP: 60.430-170, Fortaleza, Ceará, Brasil. (fgerhar@gmail.com; jmafez@uol.com.br)

Data de submissão: 07/08/2024

RESUMO: Entre as doenças que afetam o metabolismo ósseo, a periodontite é uma doença imuno-inflamatória cuja patogênese envolve a resposta do hospedeiro a um biofilme disbiótico que pode levar à destruição progressiva do osso alveolar e perda dentária, comprometendo a mastigação, estética e qualidade de vida. Neste capítulo são discutidos os principais modelos experimentais usados para o estudo da periodontite, fundamentais para entender a doença e testar novos tratamentos. Ainda, é abordado o papel medicinal das plantas, com ênfase para o potencial terapêutico de *Combretum leprosum* Mart., destacando o valor de um de seus metabólitos secundários, os triterpenos, na saúde óssea.

PALAVRAS-CHAVE: *Combretum leprosum*; Periodontite; Perda Óssea.

*Triterpenes and Bone Health: Therapeutic Potential of Combretum leprosum Mart. in
Periodontitis*

Abstract: Among the diseases that affect bone metabolism, periodontitis is an immunoinflammatory disease whose pathogenesis involves the host's response to a dysbiotic biofilm, which can lead to the progressive destruction of alveolar bone and tooth loss, compromising mastication, aesthetics, and quality of life. This chapter discusses the main experimental models used for the study of periodontitis, which are essential for understanding the disease and testing new treatments. Additionally, it addresses the medicinal role of plants, emphasizing the therapeutic potential of *Combretum leprosum* Mart., highlighting the value of one of its secondary metabolites, triterpenes, in bone health.

Keywords: *Combretum leprosum*; Periodontitis; Bone Loss.

1. PERIODONTITE

Dentre as doenças que afetam o metabolismo ósseo, a periodontite é uma doença imuno-inflamatória, cuja patogênese envolve a resposta do hospedeiro a um biofilme disbiótico, e se não tratada, leva à destruição progressiva do osso alveolar e perda dentária, comprometendo a mastigação, estética e afetando a qualidade de vida (Peres *et al.*, 2019).

De acordo com a Academia Americana de Periodontia e da Federação Europeia de Periodontia, a periodontite é definida como uma “doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental”, sendo classificada de acordo com seu estágio e grau (Canton *et al.*, 2018).

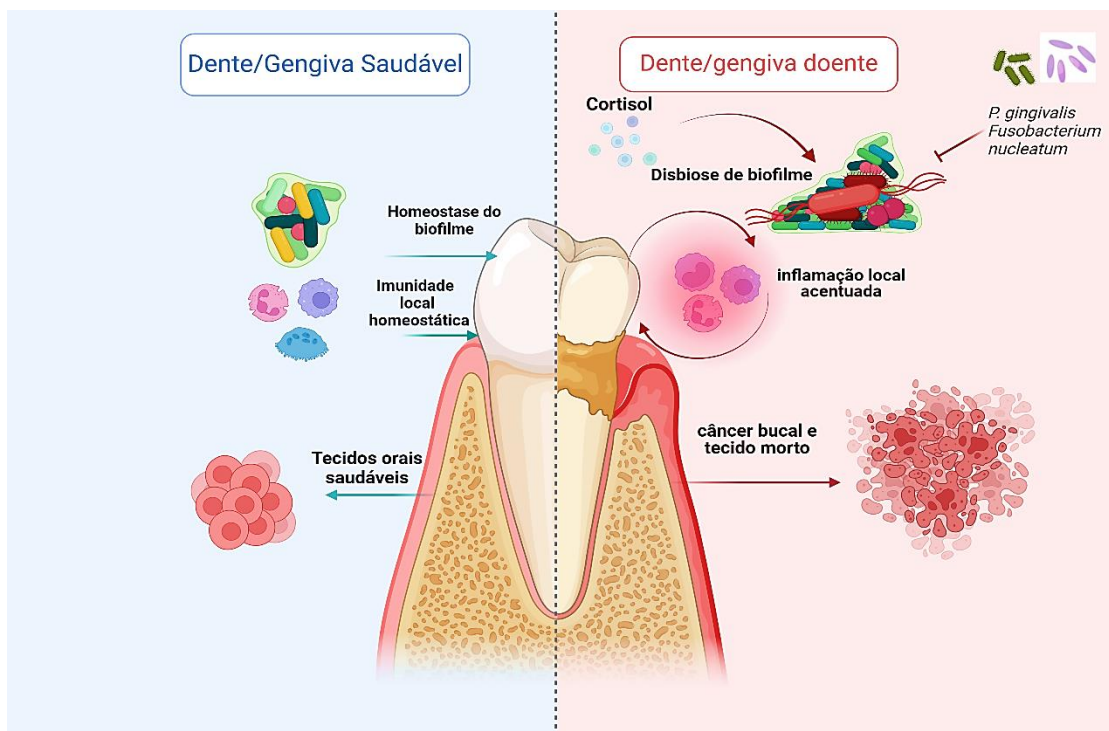
Em sua forma mais grave, a periodontite é a sexta condição mais prevalente no mundo e atinge cerca de 10% da população adulta (Frencken *et al.*, 2017). Nas últimas cinco décadas, foram feitos progressos consideráveis na compreensão da etiologia e patogênese da periodontite e das suas interações com o hospedeiro. O impacto de uma condição periodontal individual na homeostase sistêmica tornou-se mais evidente devido a esse conhecimento e impulsionou avanços em estudos que associam a periodontite a doenças e condições sistêmicas.

O termo Medicina Periodontal descreve como a infecção/inflamação periodontal pode afetar a saúde extraoral (Fischer *et al.*, 2021). De fato, a periodontite além de afetar os tecidos de sustentação dos dentes, é também fator de risco para diversas doenças (Srivastava *et*

al., 2022). Estudos destacam a importância da saúde bucal em condições sistêmicas, incluindo anormalidades relacionadas aos sistemas cardiovascular, respiratório, musculoesquelético e reprodutivo (Liccardo et al., 2019; Xu et al., 2020).

Para uma melhor compreensão sobre o tecido ósseo e os processos de reabsorção e formação óssea em condições de normalidade ou de doença, os modelos experimentais são extremamente úteis. Nesse contexto, modelos de periodontite induzida por ligadura têm sido utilizados para investigar os mecanismos da patogênese da doença e testar o potencial de novos compostos terapêuticos (Abe; Hajishengallis, 2013; Freire, *et al.* 2019; Pinto *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2017; França *et al.*, 2021).

Figura 2 – Homeostase versus Inflamação na Saúde Oral e Periodontite



Legenda: À esquerda são ilustrados tecidos orais em condição saudável, evidenciando a homeostase do biofilme e a manutenção da imunidade local. À direita, destaca-se a inflamação local pronunciada e a presença de patógenos bacterianos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

2. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA PERIODONTITE

Modelos animais para estudo da periodontite podem ser estabelecidos em diferentes espécies, como ratos, camundongos, cães, porcos e primatas não-humanos. Em comparação aos animais de grande porte, como os cães, porcos e primatas não-humanos, os de pequeno porte,

como ratos e camundongos, apresentam vantagens, dentre elas: fácil manuseio, melhor adaptabilidade ambiental e alta capacidade reprodutiva. Essas características facilitam a realização de experimento e possibilitando que o estudo seja executado com um número relativamente grande de animais experimentais (Zhang *et al.*, 2023).

Modelos murinos têm sido utilizados no estudo experimental da periodontite (Abe; Hajishengallis, 2013; Melo *et al.*, 2023) e permitem examinar diversas hipóteses biológicas relacionadas à patogênese da doença, interações hospedeiro-bactéria e abordagens terapêuticas, sendo capazes de, pelo menos em parte, reproduzir finamente os aspectos clínicos, moleculares, e características histológicas da periodontite humana. A periodontite experimental em camundongos pode ser induzida de diferentes modos, como gavagem oral, inoculação periodontal de bactérias associadas à doença periodontal, quimicamente ou por ligadura (Rojas *et al.*, 2021).

O método por ligadura é um dos modelos mais utilizados em pesquisas periodontais (De Souza Malta *et al.*, 2019). Um fio de algodão, seda ou nylon é colocado na área cervical dos molares maxilares ou mandibulares de ratos e/ou camundongos para induzir um grande acúmulo de placa e ulceração do epitélio do sulco. A placa aderida sobre o fio facilita a invasão para o tecido conjuntivo e leva a alterações no tecido periodontal similares às observadas em periodontites humanas, como ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias e perda das fibras do ligamento periodontal e destruição óssea (Klausen, 1991).

Em ratos livres de microrganismos, a colocação de ligaduras não induz a uma significativa inflamação gengival ou perda óssea (Rovin; Costich; Gordon, 1966), igualmente como a utilização de antimicrobianos reduz a perda de inserção e a reabsorção óssea, confirmando o papel das bactérias no início e na progressão da destruição tecidual nestes modelos (Kenworthy; Baverel, 1981). Seguindo este raciocínio, porém visando uma indução mais rápida e evidente da doença periodontal, alguns pesquisadores optam pela colocação de ligaduras embebidas em bactérias periodontopatogênicas. Em ratos, a perda dos tecidos de inserção e perda óssea ocorre previsivelmente em um período de sete dias (Bezerra *et al.*, 2002).

Embora a raspagem e alisamento coronorradicular seja considerado o método mais eficaz no tratamento da periodontite, nem todos os pacientes se beneficiam dessa técnica, estimulando a pesquisa básica e clínica por tratamentos complementares.

3. PLANTAS COM USO MEDICINAL

As plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental na farmácia e medicina modernas, oferecendo uma vasta gama de compostos bioativos com potencial terapêutico significativo. O uso de plantas para tratar doenças é uma prática que se origina em tempos remotos e permanece comum em muitas culturas ao redor do mundo. Na medicina moderna, a importância dessas plantas é ainda mais evidente, dado o aumento da demanda por tratamentos mais seguros e eficazes (Heinrich *et al.*, 2015). O estudo conduzido por Chibuzor *et al.* (2024) demonstra o potencial das plantas medicinais como fontes de compostos bioativos com propriedades terapêuticas significativas, incluindo: alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos e terpenoides. No entanto, a identificação, isolamento e caracterização desses compostos são passos cruciais para o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam seguros e eficazes para tratamentos a longo prazo (Singh *et al.*, 2023; Ravichandran *et al.*, 2023).

Assim, o estudo e a aplicação de plantas medicinais oferecem uma promessa significativa para o desenvolvimento de terapias inovadoras. A integração de conhecimentos tradicionais com a pesquisa científica moderna pode levar à descoberta de novas abordagens terapêuticas, beneficiando tanto a indústria farmacêutica quanto a saúde pública. A utilização de plantas medicinais como fontes de compostos bioativos não apenas promove a saúde humana, mas também contribui para a preservação do conhecimento etnobotânico e a sustentabilidade ambiental (Singh *et al.*, 2023; Ravichandran *et al.*, 2023).

4. POTENCIAL TERAPÊUTICO DE *Combretum leprosum* Mart. no DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Os medicamentos à base de plantas têm desempenhado um papel crescente e relevante à nível global no tratamento de diversas doenças, impulsionando a busca por novas substâncias bioativas. Destacam-se entre as famílias de plantas estudadas aquelas do gênero *Combretum*. A família Combretaceae, consiste de 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum* possuindo aproximadamente 370 espécies. O gênero *Combretum* (Combretaceae) apresenta cerca de 10% de suas espécies citadas na literatura com uso etnofarmacológico principalmente no tratamento de doenças como câncer, lepra, febres tropicais e cólicas (Breytenbac; Malan, 1989).

Combretum leprosum é uma espécie encontrada nos estados do norte e nordeste brasileiros (Marinho *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2007). As espécies desse gênero apresentam inúmeros metabólitos secundários como taninos, saponinas, flavonóides, cumarinas, alcaloides,

di e triterpenos, dentre outros (Lima *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2015). Conhecida popularmente pelo nome de mofumbo, a espécie é utilizada como planta medicinal com função cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, como sedativo (Petrovski *et al.*, 2006), antitussígeno e expectorante (Agra *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos realizados em espécies do gênero *Combretum* identificaram diversas classes de compostos químicos bioativos, incluindo o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (CL-1). A literatura ressalta o amplo potencial farmacológico do CLF-1, evidenciando sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antiparasitária, analgésica, cicatrizante e antibacteriana, além de seu efeito antitumoral (DOS SANTOS, 2022). Viau *et al.* (2014) relataram que *C. leprosum* é rico em metabólitos secundários incluindo cicloartanos, flavonóides (3-O metilquercetina, 5,3 β -dihidroxi -3,7,4 β trimetoxiflavona, 5,3 β ,4 β -trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona e quercetina) e triterpenos (ácido arjunólico, ácido mólico e 3 β ,6 β ,16 β trihidroxi-lup-20(29)-eno).

Os triterpenos desempenham um papel importante como compostos de sinalização e reguladores de crescimento em plantas (Singh *et al.*, 2023). A identificação, isolamento e caracterização dos reservatórios fitoquímicos presentes em plantas medicinais pode contribuir no desenvolvimento de novos fármacos, complementando drogas sintéticas com alternativas naturais (Chihomvu *et al.*, 2024). Nesse sentido, a partir do triterpeno CL-1 das flores de *C. leprosum* nosso grupo de pesquisa produziu um triterpeno semissintético: 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) que demonstrou a ausência de toxicidade em fibroblastos murinos (L929) e em queratinócitos humanos (HaCaT), além de atividade antinociceptiva em camundongos (Patente n^o: BR10202000346). Além das atividades já demonstradas com relação ao *C. leprosum*, os triterpenos também parecem exercer atividade sobre o metabolismo ósseo.

Figura 3 - *Combretum leprosum* (Mofumbo) em local de coleta



Legenda: *C. leprosum* é uma espécie arbustiva ou arvoreta, com 2 - 3 m de altura. Suas inflorescências são grandes, compostas por muitas flores amareladas, pequenas e muito perfumadas. Na base da flor forma um pequeno tubo onde é produzido e armazenado o néctar, é o principal recurso coletado pelas abelhas nativas. Além disso, suas flores são muito atrativas para outros insetos como borboletas, mariposas e vespas.

Fonte: Acervo pessoal do Prof. Geraldo Barbosa.

5. TRITERPENOS E SAÚDE ÓSSEA

O osso é um órgão metabolicamente ativo que sofre constante remodelação ao longo da vida, sendo esse fenômeno regulado pela destruição óssea osteoclástica e formação óssea osteoblástica (Neumann *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). A homeostasia óssea depende de uma atividade equilibrada entre essas células. Assim, quando há uma atividade excessiva dos osteoclastos, uma reabsorção óssea patológica é desencadeada (Lin *et al.*, 2021). Produtos naturais têm sido usados tradicionalmente há muito tempo no tratamento da perda óssea. Atenção tem sido focada nos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais. Nesse sentido, dados da literatura sugerem que os triterpenos podem modular o metabolismo ósseo (Porwal *et al.*, 2017).

De fato, o estudo de Im *et al.* (2016) demonstrou que os compostos bioativos presentes no *Combretum leprosum*, especialmente os triterpenos, inibem a reabsorção óssea e que esse efeito pareceu estar ligado à capacidade desses compostos de modularem negativamente a atividade dos osteoclastos.

Complementando esses achados, o estudo de Park *et al.* (2021) investigou o obacunona, que é um triterpeno do tipo limonóide isolado da casca da raiz de *Dictamnus dasycarpus* Turcz (*Dictamni Radicis Cortex*). Este estudo revelou que esses compostos também podem promover a diferenciação dos osteoblastos e a mineralização da matriz óssea e que o triterpeno limonoide obacunona aumenta a expressão do fator de transcrição relacionado a runt-2 (RUNX2), promovendo a diferenciação e a função dos osteoblastos. Isso sugere que, além de inibir a reabsorção óssea, alguns triterpenos podem também estimular a formação óssea, oferecendo uma abordagem terapêutica dupla para o tratamento de doenças ósseas (Park *et al.*, 2021).

Assim, entender as possíveis conexões entre triterpenos e saúde óssea poderia abrir caminhos para novos tratamentos de doenças inflamatórias ósseas, incluindo osteoporose, artrite reumatoide e periodontite.

6. CONCLUSÃO

O impacto da periodontite sobre a qualidade de vida das pessoas e sobre os serviços de saúde, somado ao potencial terapêutico de compostos obtidos de plantas, deve ser a mola propulsora da pesquisa básica e clínica para geração de tecnologias estratégicas partir de plantas já usadas pela comunidade de forma medicinal, podendo levar ao desenvolvimento de um produto com elevado potencial biotecnológico para a produção de um novo fármaco antirreabsortivo.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. **Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice**. *Journal of Immunological Methods*, Philadelphia, v. 394, n. 1-2, p. 49-54, 2013.
- AGRA, M. F. et al. **Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano"**, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 383-95, 2007.
- BEZERRA, M. M. *et al.* **Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Prevents Alveolar Bone Loss**. *Journal of periodontology*, Chicago, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.
- BREYTENBACH, J. C.; MALAN, S. F. **Pharmacochemical properties of Combretum zeyheri**. *S. Afr. J. Sci.*, v. 85, p. 372-74, 1989.
- CATON, J. G. et al. **A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification**. *J Clin Periodontol.*, v. 45, Suppl 20, p. S1-S8, jun. 2018.

CHAVES, E.M.F. *et al.* **Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 555-557, 2007.

CHIBUZOR, J. V. *et al.* **Preliminary Phytochemical, Antioxidative and Antibacterial Screening of Selected Medicinal Plants for Possible use in the Treatment of Bacterial Diseases.** Journal of Pharmaceutical Research International, v. 36, n. 1, p. 38-60, 2024.

DE SOUZA MALTA, F. *et al.* **Lithium chloride assuages bone loss in experimental periodontitis in estrogen-deficient rats.** Clinical Oral Investigations, 2019.

FARIAS, R. R. S. *et al.* **Prospecção científica e tecnológica das espécies Combretum duarceanum Cambesse Combretum mellifluum Eichler.** Revista GEINTEC. v. 5, n.1, p.1606-1616, 2015.

FISCHER, R. G.; GOMES FILHO, I. S.; CRUZ, S. S. D.; OLIVEIRA, V. B.; LIRA-JUNIOR, R.; SCANNAPIECO, F. A.; REGO, R. O. **What is the future of Periodontal Medicine?** Braz Oral Res., v. 35, 2021.

FREIRE, J. M. O. *et al.* **Protective effect of Platymiscium floribundum Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats.** PLoS One, v. 14, n. 11, e0223800, 2019.

FRENCKEN, J. E. *et al.* **Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review.** J Clin Periodontol., v. 44, p. 94-105, 2017.

IM, N. K.; LEE, D. S.; LEE, S. R.; JEONG, G. S. **Lupeol isolated from Sorbus commixta suppresses $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -mediated osteoclast differentiation and bone loss in vitro and in vivo.** Journal of Natural Products, 2015.

KENWORTHY, R.; BAVEREL, M. **Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate.** Journal of Clinical Periodontology, v. 8, n. 4, p. 341-346, 1981.

KLAUSEN, B. **Microbiological and Immunological Aspects of Experimental Periodontal Disease in Rats : J Periodontol,** 1991.

LICCARDRO, D. *et al.* **Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease.** Int J Mol Sci, v. 20, n. 6, p. 1414, 2019.

LIMA, G. R. M. *et al.* **Bioactivities of the Genus Combretum (Combretaceae): A Review.** Molecules, v. 17, 9142-9206, 2012.

LIN, P. *et al.* **Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular mechanism of periodontal disease.** International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 16, p. 8900, 2021.

MARINHO, I. V. *et al.* **Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação.** In: I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. João Pessoa, 2002.

MELO, I. M. *et al.* **Calotropis procera latex protein reduces inflammation and bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats.** Archives of Oral Biology, v. 147, 2023.

NEUMANN, E. et al. **Adipokines in bone disease.** *Nature Reviews Rheumatology*, v. 12, p. 296–302, 2016.

PARK, K.-R.; KIM, S.; CHO, M.; YUN, H.-M. **Limonoid triterpene, obacunone increases runt-related transcription factor 2 to promote osteoblast differentiation and function.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 2483, 2021.

PERES, M. A. et al. **Oral diseases: a global public health challenge.** *Lancet*, v. 394, n. 10194, p. 249-260, 2019.

PINTO, I. R. et al. **A semi-synthetic flavonoid from Bauhinia pulchella stem attenuates inflammatory osteolysis in periodontitis in rats: Impact on cytokine levels, oxidative stress, and RANK/RANKL/OPG pathway.** *Archives of Oral Biology*, v. 117, 2020.

PORWAL, K. et al. **Guava fruit extract and its triterpene constituents have osteoanabolic effect: Stimulation of osteoblast differentiation by activation of mitochondrial respiration via the Wnt/ β -catenin signaling.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 44, p. 22-34, 2017.

ROJAS, C. et al. **Humanized mouse models for the study of periodontitis: an opportunity to elucidate unresolved aspects of its immunopathogenesis and analyze new immunotherapeutic strategies.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 663328, 2021.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. **The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats.** *J periodont*, p. 193–203, 1966.

SINGH, Luwangshangbam James et al. **Medicinal plants as sources of terpenoids and their impact on Central Nervous System disorders: A review.** *Journal of Phytopharmacology*, v. 12, n. 2, p. 104-110, 2023.

SRIVASTAVA, R. *et al.* **Osteometabolism: Metabolic Alterations in Bone Pathologies.** *Cells*, v. 11, 2022.

TEIXEIRA, A. H. et al. **Stemodia maritima L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model.** *Frontiers in Physiology*, v. 8, p. 988, 2017.

XU, W. et al. **Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis.** *Adv Protein Chem Struct Biol*, v. 120, p. 45-84, 2020.

ZHANG, X.; XU, M.; XUE, Q.; HE, Y. **A modified method for constructing experimental rat periodontitis model.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 2451, 2023.

ZHANG, Y. et al. **Bone-Adipose Tissue Crosstalk: Role of Adipose Tissue Derived Extracellular Vesicles in Bone Diseases.** *J Cell Physiol*, p.1–13, 2021.

ANÁLISE DA TOXICIDADE *IN VIVO* DE UM TRITERPENO SEMISSINTÉTICO (CL-P2) E ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DE UM HIDROGEL DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE CL-P2 NO MODELO DE PERIODONTITE EM CAMUNDONGAS *SWISS*.

Erika Vanessa Farias dos Santos ^a; Ernando Igo Teixeira de Assis ^b; Luzia Hermínia Teixeira de Sousa ^c; Maria Letícia Caetano Araújo ^d; Diego Menezes ^d; Francisco Geraldo Barbosa ^e; Jair Mafezoli ^e; Alana Godinho; Anderson Weiny Barbalho Silva ^b; Hellíada Vasconcelos Chaves ^c; Jordânia Marques de Oliveira Freire ^a; Mirna Marques Bezerra Brayner ^{d*}

a - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (erikafarias7@outlook.com; jordaniafreire25@gmail.com)

b - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Professor Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.(ernandoigor@gmail.com; andersonweiny@sobral.ufc.br)

c - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (luziaherminia@hotmail.com; helliadachaves@yahoo.com.br)

d - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby – CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brasil. (leticiacaetano440@gmail.com; mirnabrayner@gmail.com)

e - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará – campus Pici. Rua Delmiro de Farias, s/n - Rodolfo Teófilo, CEP: 60.430-170, Fortaleza, Ceará, Brasil. (fgerhar@gmail.com; jmafez@uol.com.br)

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Combretum leprosum* is a species popularly used in Brazil as an anti-inflammatory agent. Phytochemical studies in the genus *Combretum* have demonstrated the presence of several classes of bioactive compounds, including the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxylup-20(29)-ene (CL-1). **OBJECTIVE:** To evaluate the in vivo toxicity of the compound CL-P2, a semisynthetic triterpene obtained from CL-1, and the antiresorptive activity of a CL-P2 delivery system hydrogel in the periodontitis model in Swiss mice. The project was approved by CEUA-UFC Sobral (01/20). **METHODS:** Toxicity tests were performed using the Oral Toxicity protocol (OECD no. 425). For this, female Swiss mice (n=10) from the Central Bioterium of the Federal University of Ceará were used. The experimental groups included: Control (saline) and treatment with CL-P2 (175, 550 and 2000 mg/kg). Behavioral parameters were evaluated for 14 days. On the 15th day after euthanasia, blood was collected for analysis of uric acid, creatinine, ALT and AST levels. Organs were collected for histopathological analysis (H&E). Forty-eight female Swiss mice were used for the periodontitis assay. Periodontitis was induced by cotton thread (5.0) in the first lower molars. The groups included: naïve; periodontitis+vehicle hydrogel; periodontitis+CL-P2 hydrogel (1 or 10mg), applied 2x/d/14d. On the 15th day, the animals were euthanized and the hemiarches were collected for morphometric and histometric analyses (ImageJ® software) of the alveolar bone. Peripheral blood was collected for measurement of bone alkaline phosphatase (BAP). Ovaries were also collected to analyze the preclinical safety of the CL-P2 hydrogel on reproductive health. The Shapiro-Wilk test and ANOVA (Tukey) were used for statistical analysis, considering p<0.05 as significant. **RESULTS:** No mortality was observed during the 14 days of the test. In the behavioral analysis, an increase in the number of licks and drowsiness was observed at the beginning of treatment with CL-P2, with no significant changes in other parameters, such as body weight, liver and kidney functions and reproductive system. The hydrogel with CL-P2 10 mg/kg reduced alveolar bone loss with increased BAP levels. The use of the hydrogel did not negatively impact the survival and development of ovarian follicles, suggesting the safety of the compound on the reproductive health of mice. **CONCLUSION:** CL-P2 may represent a product with biotechnological potential for the production of a new antiresorptive drug.

Keywords: *Combretum leprosum*; Periodontitis; Bone Loss; Ovarian Follicles.

1 INTRODUÇÃO

O *Combretum leprosum* é amplamente reconhecido por suas propriedades farmacológicas e etnobotânicas, sendo uma planta valorizada tanto pela medicina tradicional quanto por seus potenciais usos científicos. Entre os compostos bioativos isolados dessa espécie, destaca-se o triterpeno 3β - 6β - 16β -trihidroxilup-20(29)-eno (CL-1), cujas atividades antitumoral, anti-inflamatória e cicatrizante têm sido evidenciadas em diversos estudos (Alcântara *et al.*, 2022).

A periodontite é uma das doenças crônicas mais prevalentes que afetam o metabolismo ósseo. Além de comprometer os tecidos de sustentação dos dentes, essa condição está associada a uma série de comorbidades sistêmicas, como doenças cardiovasculares e reprodutivas. Estudos sugerem que a inflamação sistêmica causada pela periodontite pode, inclusive, desencadear disfunções ovarianas e resistência à insulina, afetando a saúde reprodutiva feminina (Frencken *et al.*, 2017; Jaglan *et al.*, 2024).

Para avaliar os efeitos terapêuticos de novos compostos no tratamento da periodontite, modelos animais, especialmente com camundongos, são amplamente utilizados. Esses modelos permitem a simulação dos processos patológicos da periodontite e a investigação de tratamentos potencialmente eficazes, como o uso de triterpenos. Sua acessibilidade e capacidade de reproduzir características clínicas tornam esses modelos ferramentas importantes para estudar tanto o impacto sobre o tecido ósseo quanto a segurança desses compostos (Abe e Hajishengallis, 2013; Zhang *et al.*, 2023).

Considerando o potencial terapêutico do *C. leprosum*, o relatado efeito dos triterpenos sobre o metabolismo ósseo (Im *et al.*, 2016), os impactos orais e extra-orais da periodontite, este estudo visa avaliar a toxicidade *in vivo* do CL-P2, um triterpeno semissintético obtido a partir de CL-1, assim como a eficácia de um hidrogel de sistema de liberação de CL-P2 no modelo de periodontite em camundongas *Swiss*. Além disso, será investigado o impacto dessa terapia na sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos.

2 METODOLOGIA

2.1. Metodologia relacionada ao objetivo específico 3.2.1:

Realização do teste de toxicidade aguda do composto do CL-P2, utilizando protocolo experimental OECD 425

Ensaio de Toxicidade Oral Aguda: Procedimento Up and Down n° 425 (OECD)

O teste de toxicidade oral aguda é uma etapa fundamental dentro da pesquisa por um novo composto com potencial farmacológico pois permite avaliar a toxicidade de um composto quando administrado em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 h, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. É utilizado como um rastreio inicial de toxicidade, permitindo estimar a dose letal (DL50) e classificar a amostra de acordo com os critérios do Globally Harmonised System (GHS) (Anvisa, 2013; 2016). Um dos testes realizados in vivo é a Toxicidade Oral Aguda em que se investiga a toxicidade produzida por uma substância teste na concentração máxima de 2000 mg/kg e, quando justificável, na concentração máxima de 5000 mg/kg seguindo o protocolo Up and down n°425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2008).

Animais

Camundongos Swiss (fêmeas) n=10, pesando em média 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral, UFC-Campus Sobral e foram alojados em gaiolas de plástico de polipropileno padronizadas em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) obedecendo aos ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no Biotério Setorial da UFC - Campus Sobral durante o experimento, recebendo água e alimentação ad libitum à vontade. O número de animais usados foi de n=6 ou n=5 por grupo, todos os grupos foram randomizados e cada animal foi usado apenas uma vez. Foi utilizado, portanto, o número de animais mínimo necessário para atingir um valor estatístico baseando-se em estudos científicos publicados anteriormente (OECD,2008). Todos os esforços foram realizados para minimizar quaisquer tipos de sofrimento aos animais. Os pesos dos animais foram registrados nos dias 1º, 7º e 14º do teste. No 15º dia, o animal era pesado e verificado seu estado de saúde no final do período do protocolo experimental. Os animais foram divididos em grupo salina (controle) e grupo que recebeu CL-P2 (175, 550 e 2000mg/kg).

Avaliação Comportamental

Os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos após a dosagem, periodicamente durante as primeiras 24 horas (com atenção especial durante as primeiras 4 horas) e diariamente a partir de então, por um total de 14 dias. Todas as observações foram registradas sistematicamente, sendo mantidos registros individuais para cada animal. Os parâmetros avaliados foram: agitação, agressividade, cambalhota, contorção, lambida, perda de peso, piloereção, pulsão sexual e sonolência.

O teste principal consistiu em uma progressão de dose única ordenada, na qual os animais receberam uma dose de cada vez, em um intervalo mínimo de 24 horas. O primeiro animal recebeu uma dose de 175 mg/kg, onde o mesmo sobreviveu, permitindo que o teste seguisse para a próxima dose que foi aumentada para 550 mg/kg, em caso de morte desse animal, a dose para o próximo seria reduzida em uma progressão de dose semelhante. Com a sobrevivência do animal da dose de 550 mg/kg, seguiu-se para a dose máxima de 2000 mg/kg, onde essa dose foi administrada em 3 animais por dias consecutivos, obtendo êxito na taxa de sobrevivência e finalizando o protocolo.

Coletas de amostras biológicas

No 15º dia, cada animal recebia uma dose de overdose de Ketamina 300mg/kg + Xilazina 30mg/kg (via peritoneal). Após avaliação técnica do estado de saúde do animal, eram coletadas amostras de sangue variando entre 900 µL e 1 mL (via aorta abdominal), centrifugadas no tubo coleta de sangue vácuo amarelo ativador de coágulo + gel 5mL e armazenadas no freezer -80°C, para análise dos níveis séricos de ácido úrico, creatinina, enzima alanina aminotransferase (ALT) e enzima aspartato aminotransferase (AST) por laboratório tercerizado LACLISO VET. Os órgãos: baço, coração, fígado e rim foram retirados após a eutanásia e armazenados em formaldeído a 4% tamponado para avaliação técnica do patologista.

Processamento das amostras histopatológicas

Para fixação: após retirada os órgãos, deve-se imergir em um volume de 10x a 20x o tamanho das amostras em formol tamponado por 24h. Após 24h, realiza cortes longitudinais dos órgãos (cortes frontais) – secciona com navalha ou lâmina de bisturi - e submergido por 48h no formol tamponado 10%. Após a etapa do Formol Tamponado, lavou-se as amostras em água de torneira e trocou-se a solução para álcool 70%. O protocolo de preparação das amostras aconteceu mediante as seguintes etapas no Laboratório de Histopatologia do NEMPI:

Processamento (Desidratação e Diafanização); Inclusão, Microtomia e Coloração. Para realização da análise histopatológica das lâminas e os parâmetros avaliados: edema e congestão vascular e escores atribuídos de acordo com os níveis: 0- ausente; 1-infiltração muito leve; 2-moderado; 3 -infiltração intensa.

Ferramenta Farmacológica

A planta *C. Leprosum* foi coletada na localidade de Sítio São Bento, no município de Mombaça, Ceará, em Abril de 2022, e seu uso para fins de pesquisa foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN cadastro nº AC6B01F) para o estudo do seu efeito analgésico e antiinflamatório. A partir do derivado semissintético obtido do triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -triidroxilup-20(29)-eno (CL-1), um composto isolado da planta, e após modificações químicas estruturais, obteve-se o derivado CL-P2 que é um triterpeno de *Combretum Leprosum*, registrado na literatura como *Combretum Leprosum* Mofumbo. O derivado semissintético CL-P2 foi desenvolvido pelos Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa e Prof. Dr. Jair Mafezoli, do Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) da Universidade Federal do Ceará (UFC) no Brasil. Os detalhes estruturais do hidrogel de CL-P2 derivado semissintético não podem ser apresentados no momento, uma vez que são objeto de patente.

Metodologia relacionada ao objetivo específico 3.2.2:

Analisar a eficácia antirreabsortiva do hidrogel de CL-P2 no modelo de periodontite.

Aspectos Éticos

O estudo utilizou 48 camundongos Swiss (fêmeas), pesando em média 25g, e os grupos randomizados. Todos os esforços foram realizados para minimizar quaisquer tipos de sofrimento aos animais. O projeto de pesquisa e as metodologias utilizadas foram aprovadas no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Adendo nº 02/23 do Protocolo CEUA UFC Sobral nº 01/20 (anexo B), o aspecto ético do protocolo experimental foi elaborado de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA. Seguindo o acordo com os

preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação em Animais (CONCEA – Brasil) e do guia ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). O recurso financeiro na primeira etapa do projeto no Brasil foi realizado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP, processo nº BP5-0197-00180.01.00/22.

Modelo experimental

Após duas semanas de aclimatação ao ambiente laboratorial, os camundongos fêmeas foram submetidos à periodontite experimental (PE). Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg / kg de peso corporal) e xilazina (10 mg / kg de peso corporal) por via intraperitoneal (i.p), e em seguida receberam uma inserção bilateral de ligadura com fio de algodão (5-0) ao redor da área cervical dos primeiros molares mandibulares. Os animais foram posicionados em decúbito ventral em uma mesa para roedores com afastadores orais posicionados na região dos dentes incisivos. O fio foi inserido com auxílio de espaçadores digitais endodônticos C, de modo a criar um espaço entre os molares inferiores e facilitar a passagem do fio. A ligadura foi posicionada no sulco gengival e o nó posicionado mesialmente (Bonato et al., 2012; Oliveira et al., 2019; Pereira et al., 2019; Abe; Hajishengallis, 2013).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, com 6 animais cada, a saber: (G1) grupo naive que não recebeu qualquer tipo de intervenção; (G2) grupo periodontite que foi submetido à indução da periodontite e recebeu a aplicação do hidrogel contendo apenas veículo imediatamente após a ligadura seguido por duas aplicações diárias durante o período de 14 dias; (G3) grupo periodontite + hidrogel CL-P2 (1mg); e (G4) grupo periodontite + hidrogel CL-P2 (10mg), que receberam o hidrogel imediatamente após a indução da doença seguido por duas aplicações diárias totalizando o período de 14 dias.

No 15º dia os animais foram eutanasiados e as hemiarcadas foram usadas para análises morfológicas do osso alveolar, que incluirá: análise morfométrica (medida da perda óssea alveolar) e análise histopatológica (H&E). Foi coletado sangue periférico para dosagem de Fosfatase alcalina óssea (FAO) – marcador de formação óssea. Os ovários foram coletados para análise de sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos.

Análise morfométrica

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas para fixação em formol tamponado a 10%, num intervalo de 24 horas. Em seguida, as arcadas foram seccionadas em duas hemiarcadas, sendo a hemiarcada direita dissecada e corada com azul de metileno a 1% para a diferenciação entre osso e dente, os quais se coram em menor intensidade (Lima et al., 2000; Lima et al., 2004). Para quantificar a reabsorção óssea, a hemiarcada foi disposta com massa de modelar em lâmina para a realização posterior de fotografias. As imagens obtidas foram avaliadas por meio do programa digital (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA), em que será considerada a demarcação desde a junção cimento-esmalte (JCE) até a borda óssea remanescente na hemiarcada. Essa área será comparada à outra previamente conhecida (5 x 5 mm²) (Kuhr et al., 2004).

Análise histométrica

As mesmas lâminas utilizadas para processamento para H&E foram utilizadas para o estudo histométrico. A área de furca do primeiro molar e a medida da junção cimento-esmalte (JCE)-fundo da bolsa do primeiro molar foram consideradas para avaliação histométrica. Para tanto, imagens desta região foram obtidas ao microscópio (x40) e analisadas por um observador treinado, cego para o grupo ao qual a lâmina pertencia, utilizando o programa de computador Image J (ImageJ 48x, National Institute of Health; EUA) para quantificar a área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca, que é comparada com uma medida conhecida (Guimarães et al., 2016).

Dosagem dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina Óssea

Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal de todos os camundongos fêmeas. O sangue foi coletado em tubo de análises clínicas tampa vermelha (sem anticoagulante). Esperou-se sangue coagular por aproximadamente 15min e logo em seguida foi centrifugado (1500rpm por 15min) e o sobrenadante armazenado a -80oC até a análise bioquímica, obtendo-se, portanto, o soro. Uma alíquota das amostras de soro foi utilizada para a dosagem de fosfatase alcalina total, utilizando-se Kit específico para fosfatase alcalina, cuja metodologia seguiu a orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Posteriormente, novas alíquotas, das mesmas amostras do material, foram aquecidas a 56°C por 10min, em seguida dosou-se novamente as concentrações enzimáticas da amostra.

O método está fundamentado na labilidade dessa fração frente ao calor que por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (Linder *et al.*, 2013; Moss; Whitby, 1975). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por litro de soro (U/L) de acordo com o fabricante.

Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.3:

Analisar a segurança pré-clínica do hidrogel CL-P2 sobre a sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos de camundongas.

Análise Histopatológica dos Ovários

Ao final do período experimental, os ovários foram coletados, fixados em formaldeído (10%) tamponado, desidratados em uma série crescente de etanol (70%; 80%; 90%; 100%), clarificados com xilol e embebidos em parafina conforme descrito por De Assis *et al.* (2023). Para cada ovário, secções de 7 µm foram montadas em lâminas e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram examinadas pelo microscópio (Nikon) em um aumento de 100X e 400X. As análises histopatológicas dos ovários foram realizadas com objetivo de avaliar a citotoxicidade do composto com relação aos padrões morfológicos de viabilidade (normais ou degenerados), crescimento e desenvolvimento folicular. Para isso, os folículos foram classificados em primordiais (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso), primários (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato cúbico), secundários (oócito circundado por várias camadas de células da granulosa de formato cúbico) e terciários (oócito circundado por várias camadas de células do cúmulo e presença de cavidade antral bem desenvolvida). Além disso, os folículos foram individualmente classificados como morfolologicamente normais ou degenerados. Os folículos classificados como morfolologicamente normais, apresentavam oócito com núcleo visível e citoplasma regular, estava cercado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas, e não apresentavam núcleos picnóticos. Já os folículos classificados como degenerados foram definidos como aqueles que apresentavam oócito com citoplasma retraído, com núcleo picnótico e/ou cercados por células da granulosa desorganizadas, destacadas da membrana basal, e com presença de vacúolos. No total, aproximadamente 200 folículos foram avaliados para cada tratamento. As porcentagens de folículos normais ou degenerados, bem

como o percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento, foram calculados antes (grupo controle) e após o protocolo experimental.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade de distribuição dos dados, sendo assim classificados em dados paramétricos ou não paramétricos. Os “outliers” foram removidos. Grupos com distribuição normal foram analisados por teste t de Student (comparação entre dois grupos) ou ANOVA (comparação entre 3 ou mais grupos). O pós-teste utilizado com ANOVA foi definido após a aplicação do teste de homogeneidade de variâncias de Levene. Aos grupos homocedáticos foi aplicado o pós-teste de Tukey, enquanto que em grupos heterocedáticos foi utilizado o pós-teste de Games-Howell. Grupos com distribuição não paramétrica serão analisado por meio do teste de Mann-Whitney U.

Os resultados para os dados com distribuição gaussiana serão apresentados como média (M) \pm desvio padrão da média (DP). Dados com distribuição não gaussiana serão apresentados como mediana. Todos os testes estatísticos serão realizados usando o programa SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para o Windows. Os gráficos serão confeccionados com o software GraphPad Prism 7 GraphPad Prism software, La Jolla, CA, EUA) para Windows. O nível de significância estatística será definido em 95% ($p < 0,05$).

No que se refere a análise estatística da avaliação histopatológica dos ovários, foi utilizado o programa GraphPad Prisma versão 10.0. Os dados referentes a morfologia (percentual de folículos normais e degenerados), bem como os dados de desenvolvimento folicular (primordial, primário, secundário e terciário), foram avaliados usando o teste qui-quadrado. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (variáveis com distribuição normal). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

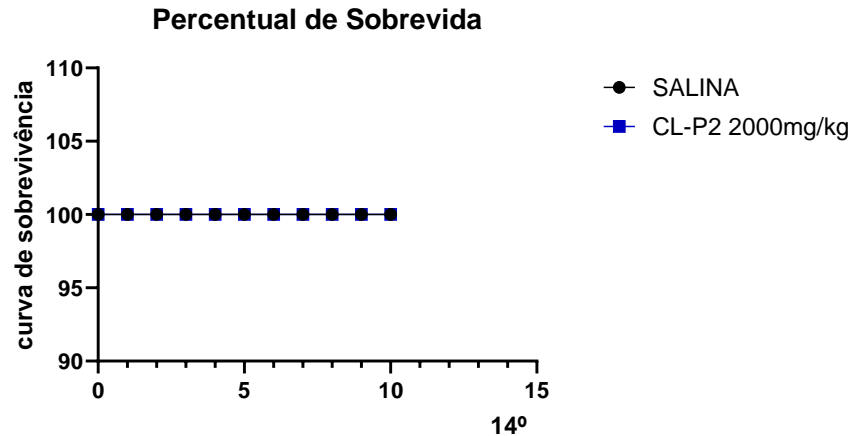
3 Resultados

3.1. Resultados do teste de toxicidade aguda do CL-P2

Taxa de sobrevivida

Não foram observadas mortalidade em nenhum dos grupos (Salina e CL-P2) durante os 14 dias do teste, observando-se uma taxa de sobrevivida de 100% (Figura 4).

Figura 4 - Taxa de sobrevivência dos animais no ensaio de segurança de CL-P2.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

Alterações comportamentais

As observações comportamentais mostraram a ocorrência de agitação, lambida e sonolência. Analisando cada um desses comportamentos ao longo dos 14 dias observou-se um aumento significativo na agitação nos animais do grupo salina nos dias 9 e 10 ($p=0,02$ e $p=0,008$), quando comparados àqueles do grupo CL-P2 (2000 mg/kg). Já para o comportamento de lambida, observou-se um aumento significativo nos dias 1, 2, 5 e 14 ($p=0,008$; $p=0,016$; $p=0,032$; $p=0,04$) nos animais do grupo CL-P2 (2000 mg/kg), quando comparado ao grupo salina. Com relação à sonolência observou-se um aumento significativo ($p=0,0079$) nos animais do grupo CL-P2 (2000 mg/kg) apenas no 1º dia de tratamento, em relação ao grupo salina. Os demais parâmetros (cambalhota, piloereção, agressividade, contorção, perda de peso, pulsão sexual e morte) não foram observados ao longo dos 14 dias do estudo.

Tabela 1 - Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança e toxicidade aguda de CL-P2 na dose única de 2000 µg/Kg.

Parâmetros Comportamentais	Salina ♀	CL-P2 ♀2000 µg/Kg
Agitação	P	P
Agressividade	A	A
Cambalhota	A	A
Contorção	A	A
Lambida	P	P
Perda de Peso	A	A
Piloereção	A	A

Pulsão Sexual	A	A
Sonolência	P	P

Legenda: P= presente e o A= ausente. A avaliação das alterações comportamentais, foram observadas imediatamente após à administração do composto semissintético CL-P2, diariamente até o 14º dia do teste.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da pesquisa (2024).

Alterações do peso corporal

Não ocorreu variação significativa no peso dos animais que receberam CL-P2 2000 mg/kg (tabela 2), quando comparado ao grupo salina durante os 14 dias de avaliação.

Tabela 2 - Efeito CL-P2 sobre o peso (g) de camundongos fêmeas (*Swiss*) em estudo de toxicidade segundo protocolo OECD 425.

Grupos	1º dia Peso (g)	7º dia Peso (g)	14º dia Peso (g)
Controle (veículo)	0,00 ± 0,00 (5)	1,40 ± 0,00 (5)	0,60 ± 0,00 (5)
CL-P2 (2000 mg/kg)	0,00 ± 0,00 (5)	1,00 ± 0,00 (5)	0,20 ± 0,00 (5)

Legenda: A Variação ponderal em camundongos tratados com CL-P2 2000 µg/kg, durante 14 dias consecutivos da dose administrada.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da pesquisa (2024).

Avaliação bioquímica de função renal e hepática

O tratamento por 14 dias consecutivos com o CL-P2 2000 mg/kg não provocou diferenças significativas nos níveis séricos de creatinina e as enzimas alanina aminotransferase (ALT), asparto aminotransferase (AST) das camundongas, quando comparado com o grupo salina (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito CL-P2 sobre os níveis séricos de creatinina, ALT e AST de camundongos fêmeas (*Swiss*) em estudo de toxicidade segundo protocolo OECD 425.

Parâmetros Bioquímicos	Unidade	Controle (veículo)	CL-P2 2000 mg/kg
	U/L		
Creatinina	mg/dl	0,47 ± 0,030	0,39 ± 0,06
ALT	U/L	22,00 ± 1,41	21,25 ± 2,50
AST	U/L	61,00 ± 16,97	64,50 ± 5,44

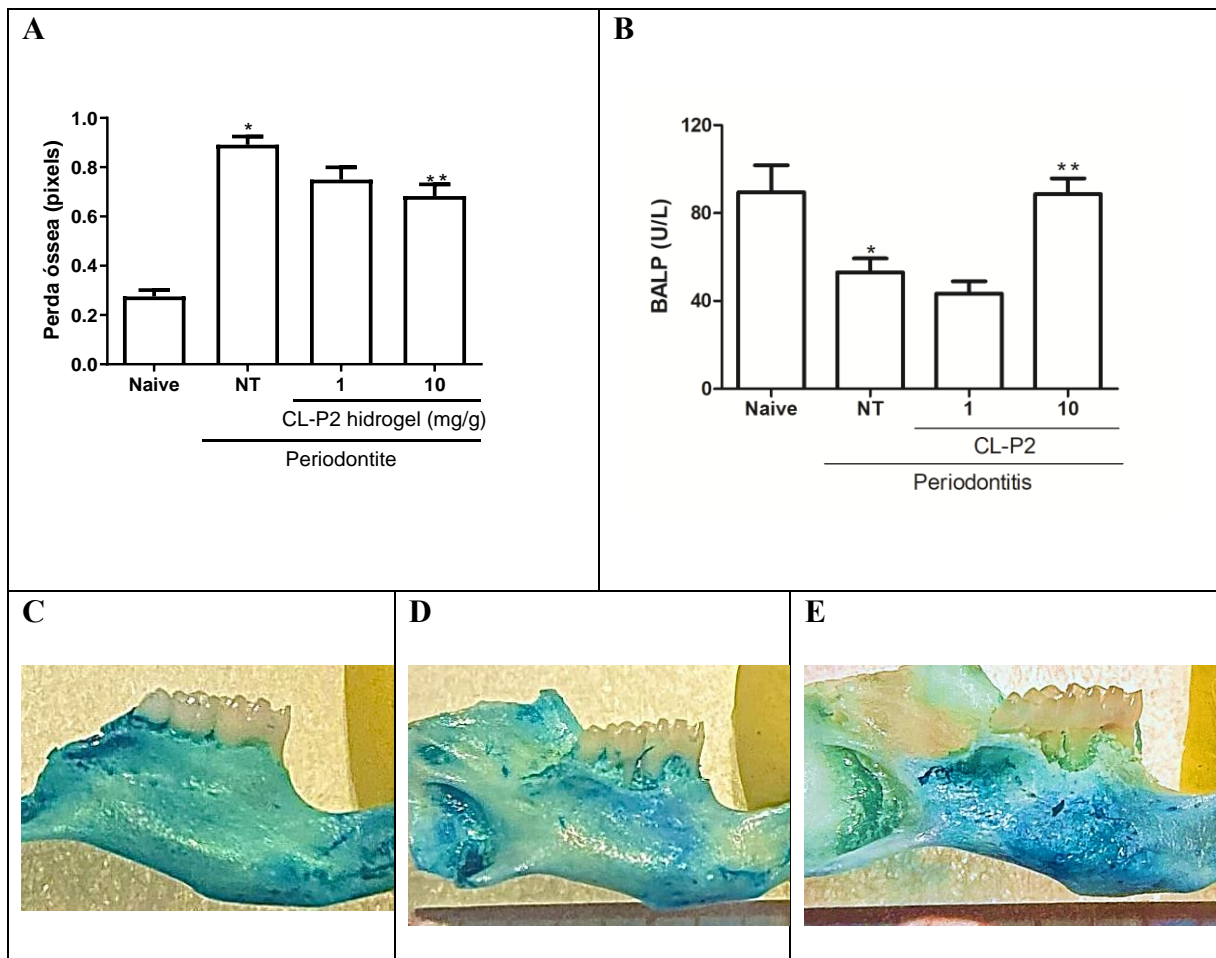
Legenda: p>0,05 em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média ± E.P.M. (ANOVA, Tukey).

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

Análise morfométrica e dosagem de FAO

Os animais tratados com o hidrogel de CL-P2 (10 mg) revelaram diminuição significativa da perda óssea alveolar, quando comparados com o grupo não tratado (NT) (Figura 5A). Ainda, quando se avaliou os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, o grupo NT apresentou redução significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao naíve. O tratamento com o hidrogel de CL-P2 (10 mg) aumentou de forma significativa os níveis desse biomarcador de formação óssea (Figura 5B). As figuras 5C, 5D e 5E ilustram a visão macroscópica das mandíbulas utilizadas para medir a perda óssea alveolar (5C = naíve; 5D = NT; 5E = grupo tratado com o hidrogel de CL-P2 (10 mg)).

Figura 5 – Efeito do hidrogel de CL-P2 na perda óssea alveolar e nos níveis de Fosfatase Alcalina Óssea



Legenda: (A) Efeito do hidrogel contendo $3\beta,6\beta,16\beta$ -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) na perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. Naíve: camundongos não submetidos à indução de periodontite. NT (não tratados): camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados com veículo (hidrogel sem CL-P2 no local da indução da doença) por 14 dias. CL-P2 (mg/g):

camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados (hidrogel contendo CL-P2 1 ou 10 mg/g no local da indução da doença) por 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n = 6 para cada tratamento). (C, D, E) Visão macroscópica do efeito do hidrogel contendo 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. (C) mandíbula de um animal do grupo naive. (D) Mandíbula de um animal do grupo NT apresentando intensa reabsorção óssea. (E) mandíbula de um animal do grupo CL-P2 10 mg/g mostrando redução da perda óssea. * p<0,05 em relação ao grupo naive; ** p<0,05 em relação ao grupo não-tratado (NT).

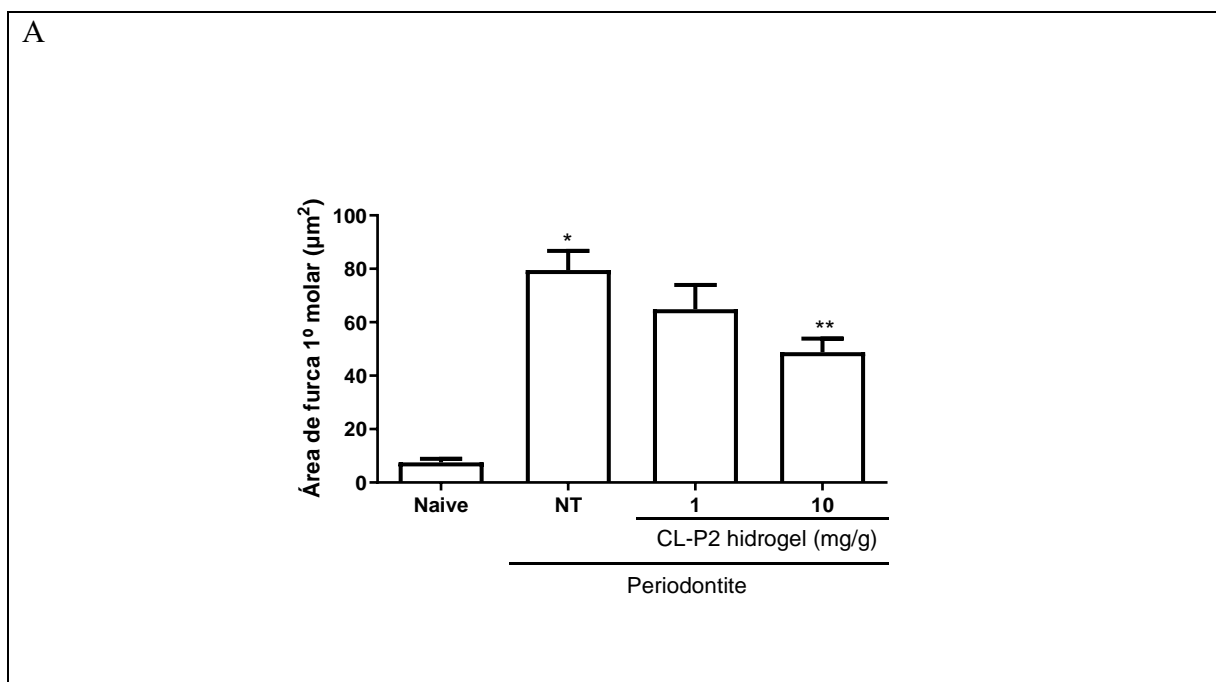
Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

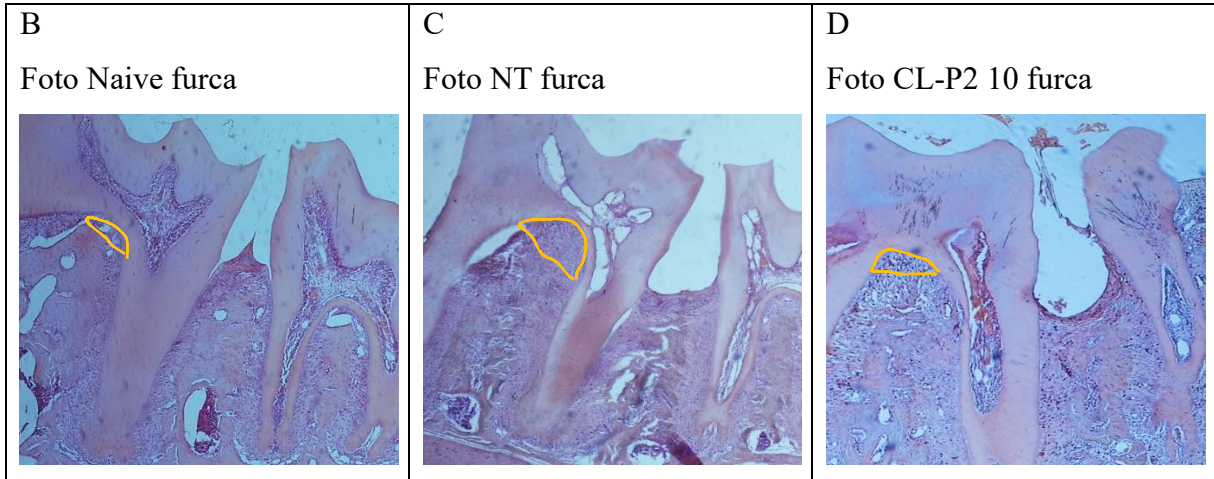
Análise histométrica

A análise histométrica mostrou que a indução da periodontite aumentou a área entre o teto da furca e a crista óssea remanescente nos animais não tratados, quando comparada com o grupo naive (Figura 6A). A aplicação do hidrogel de CL-P2 (10 mg) reduziu a reabsorção óssea da área de furca, em comparação com o grupo não tratado. As Figuras 6B, 6C e 6D ilustram secções de mandíbulas com coloração H&E, mostrando onde foi realizado o estudo histométrico na furca do primeiro molar de camundongos dos grupos naive, NT e tratados com o hidrogel de CL-P2 (10 mg), respectivamente.

Além disso, a aplicação do hidrogel de CL-P2 (10 mg) melhorou o nível de inserção, observado pela redução da distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 7A). As Figuras 7B, 7C e 7D ilustram secções de mandíbulas de camundongos com coloração HE, mostrando onde foi realizado o estudo histométrico dos grupo naive, NT e hidrogel de CL-P2 (10mg), respectivamente.

Figura 6 - Efeito do hidrogel de CL-P2 na área da furca

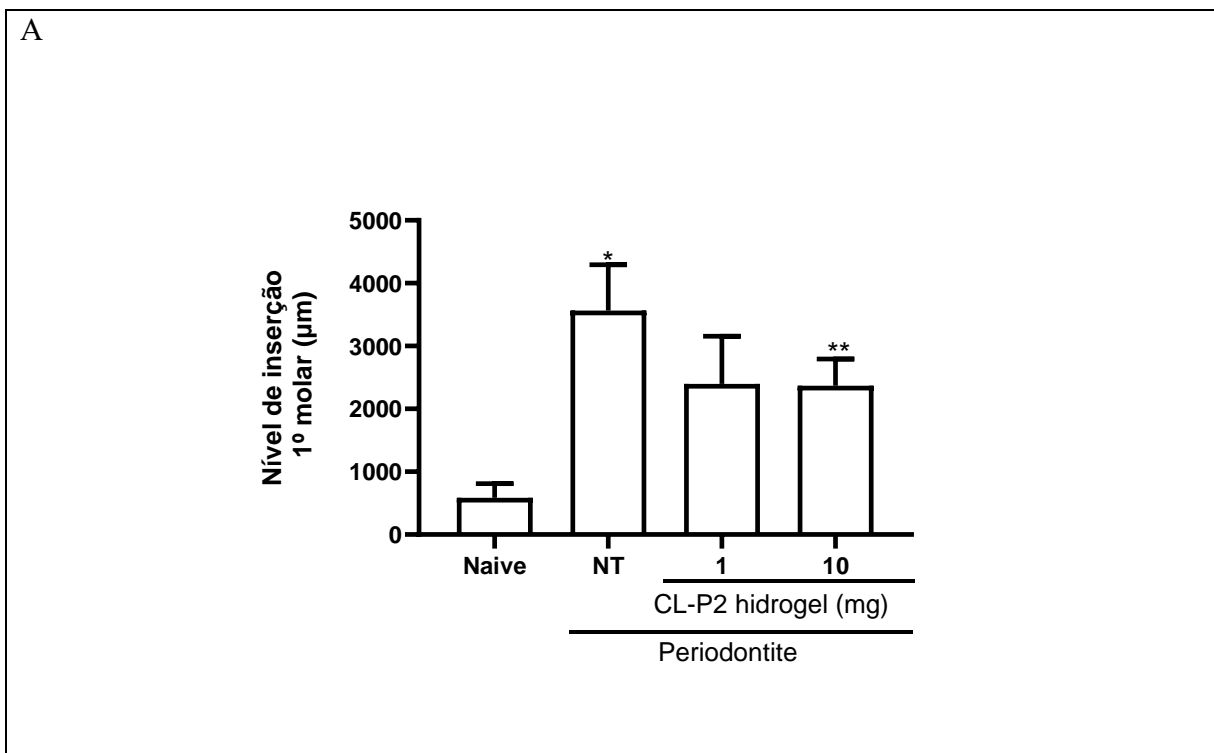




Legenda: (A) Efeito do hidrogel contendo $3\beta,6\beta,16\beta$ -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) na reabsorção óssea alveolar (área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. **Naive:** camundongos não submetidos à indução de periodontite. **NT (não tratados):** camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados com veículo (hidrogel sem CL-P2 no local da indução da doença) por 14 dias. **CL-P2 (mg/g):** camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados (hidrogel contendo CL-P2 1 ou 10 mg/g no local da indução da doença) por 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm SEM ($n = 6$ para cada tratamento). (B, C, D) Visão macroscópica do efeito do hidrogel contendo $3\beta,6\beta,16\beta$ -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. (B) mandíbula de um animal do grupo naive. (C) Mandíbula de um animal do grupo NT apresentando intensa reabsorção óssea. (D) mandíbula de um animal do grupo CL-P2 10 mg/g mostrando redução da perda óssea. (B, C e D) visão histopatológica do efeito do hidrogel contendo $3\beta,6\beta,16\beta$ -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) na reabsorção óssea alveolar (área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca - linha amarela) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas). (B) ilustra periodonto de um animal do grupo naive. (C) periodonto de um animal do grupo NT. (D) periodonto de um animal do grupo CL-P2 10 mg/g mostrando redução da perda óssea.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

Figura 7 - Efeito do hidrogel de CL-P2 no nível de inserção



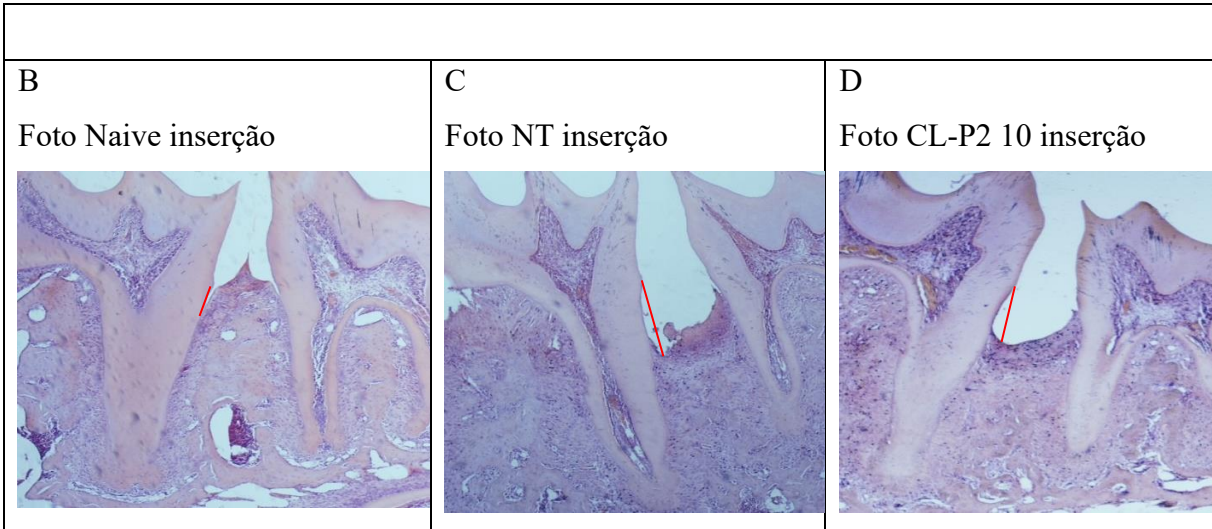


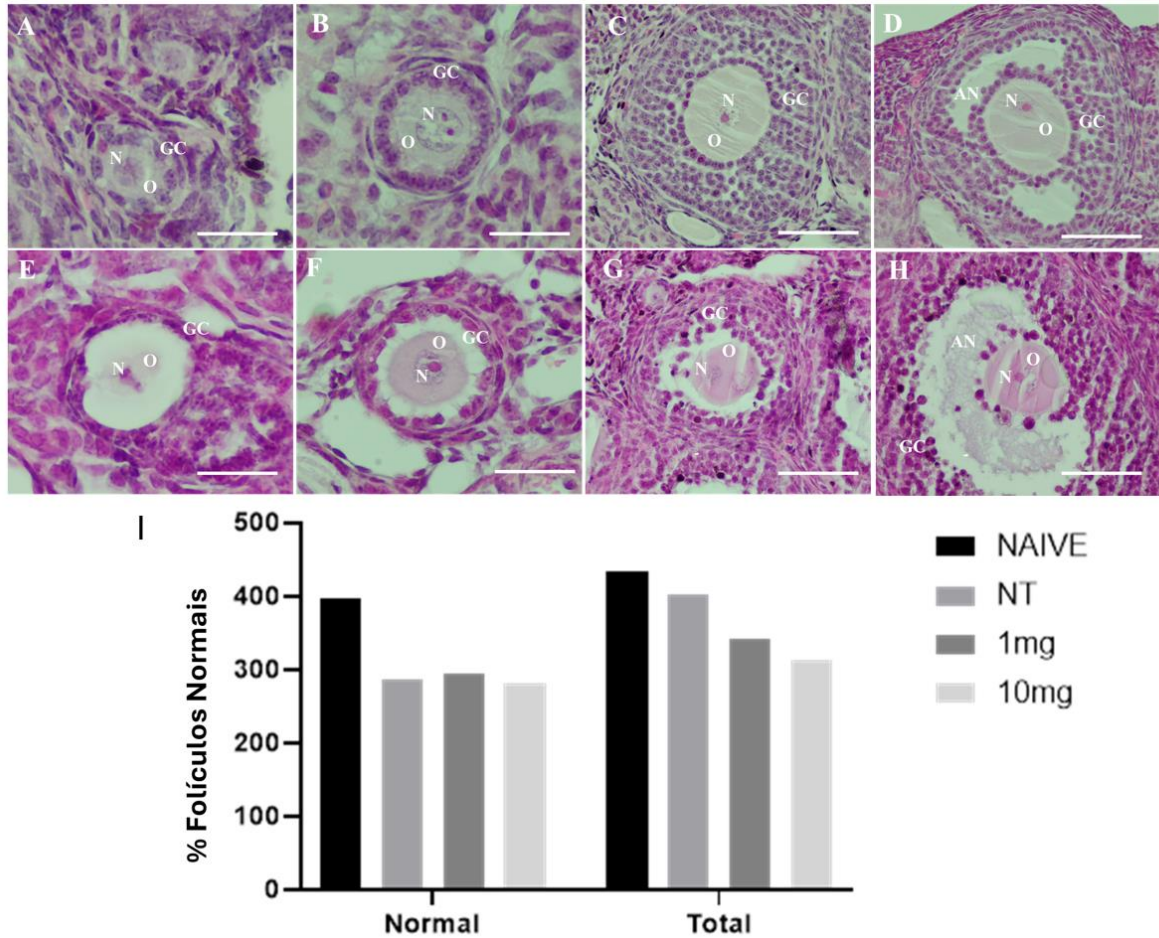
Figura 7: (A) Efeito do hidrogel contendo 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) no nível de inserção (distância da junção cimento-esmalte (JCE) até o fundo da bolsa do primeiro molar) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. **Naive:** camundongos não submetidos à indução de periodontite. **NT (não tratados):** camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados com veículo (hidrogel sem CL-P2 no local da indução da doença) por 14 dias. **CL-P2 (mg/g):** camundongos submetidos à indução de periodontite e tratados (hidrogel contendo CL-P2 1 ou 10 mg/g no local da indução da doença) por 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n = 6 para cada tratamento). (B, C, D) visão histopatológica do efeito do hidrogel contendo 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) (10 mg/g) no nível de inserção (distância da junção cimento-esmalte (JCE) até o fundo da bolsa do primeiro molar - linha amarela) na periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas). (B) ilustra periodonto de um animal do grupo naive. (C) periodonto de um animal do grupo NT. (D) periodonto de um animal do grupo CL-P2 10 mg/g mostrando redução da perda óssea. (B-D) distância da junção cimento-esmalte (JCE) até o fundo da bolsa do primeiro molar, comparado com um valor conhecido em μ m.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

Análise da sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos

Ao analisar os efeitos do composto 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) sobre a viabilidade dos folículos ovarianos de camundongas ao término do período experimental, constatou-se que o tratamento com CL-P2 (1 mg/kg e 10 mg/kg) não comprometeu a viabilidade da reserva folicular presente nos ovários. Especificamente, o composto não reduziu o percentual de folículos morfologicamente normais, indicando que as doses utilizadas não afetaram negativamente a foliculogênese nem a integridade estrutural dos folículos.

Figura 8 – Imagens e gráfico representando a morfologia e os percentuais de folículos morfologicamente normais

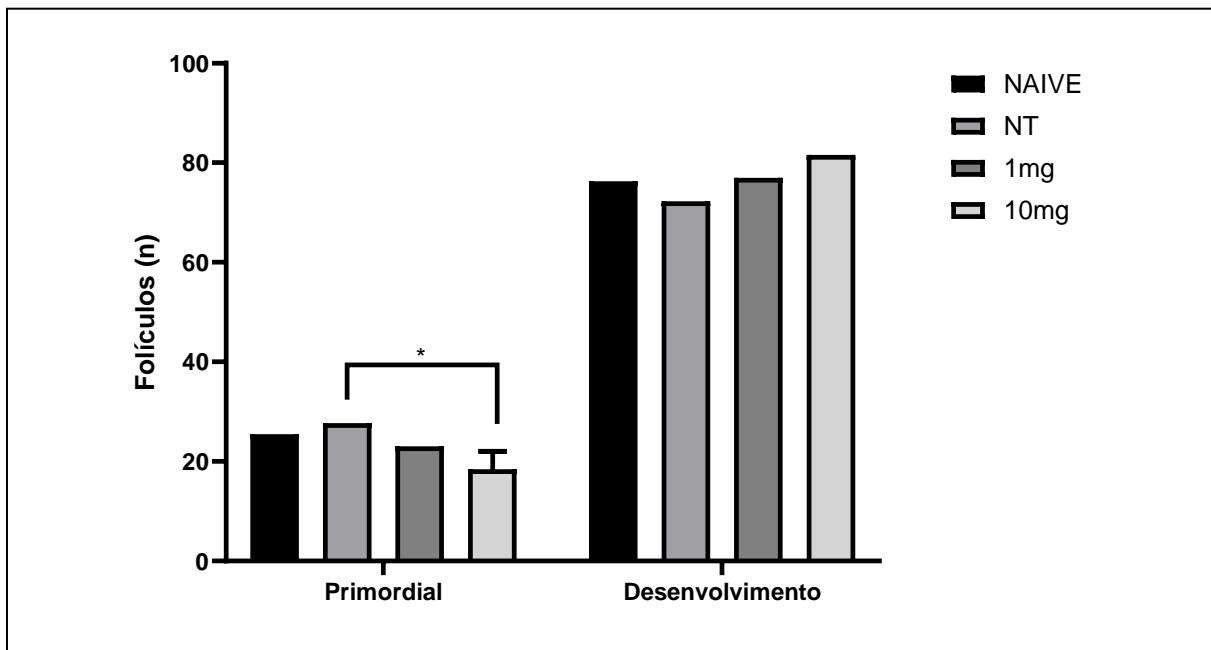


Legenda: A imagem mostra a morfologia (A-H) e os percentuais de folículos morfologicamente normais (I) no grupo controle (NT - não tratado) e em amostras tratadas por 14 dias com CL-P2 (1 mg/kg ou 10 mg/kg). As imagens de histologia ilustram os folículos ovarianos avaliados como normais ou degenerados: primordiais (A-E), primários (B-F), secundários (C-G) e terciários (D-H). A escala de imagem utilizada é de 100 μ m. Células da Granulosa (GC); oócito (O); núcleo do oócito (N). Já em (I) apresenta-se o gráfico com o percentual de folículos morfologicamente normais. O composto não reduziu o percentual de folículos morfologicamente normais, indicando que as doses utilizadas não afetaram negativamente a foliculogênese nem a integridade estrutural dos folículos.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

Nos resultados da investigação atual sobre os efeitos do 3 β ,6 β ,16 β -tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2) sobre a ativação e desenvolvimento de folículos primordiais, observou-se uma redução no percentual de folículos primordiais nos ovários das camundongas tratadas com 10 mg de CL-P2. Isso sugere uma maior taxa de ativação e crescimento folicular em comparação com o grupo não tratado. Em relação ao desenvolvimento folicular, todas as doses testadas promoveram o desenvolvimento dos folículos sem diferenças significativas entre elas, indicando que as doses utilizadas não comprometem a reserva folicular. Esses achados sugerem que a manutenção da ativação e crescimento folicular é preservada e que as doses testadas não apresentam toxicidade ao sistema reprodutor feminino em termos de foliculogênese.

Figura 9 - Incidência de folículos primordiais e em desenvolvimento



Legenda. Incidência de folículos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) em ovários de camundongas tratadas com 3β,6β,16β-tripropioniloxilup-20(29)-eno (CL-P2). A redução percentual de folículos primordiais foi observada nos ovários das camundongas tratadas com 10 mg de CL-P2, sugerindo uma maior taxa de ativação folicular em comparação ao grupo controle não tratado. O desenvolvimento folicular foi promovido em todas as doses testadas, sem diferenças significativas entre elas, apontando que o CL-P2 não compromete a reserva folicular nem apresenta efeitos tóxicos à foliculogênese.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados da Pesquisa (2024).

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar o potencial osteogênico de produtos derivados de plantas usando o modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos e camundongos. *Combretum leprosum* Mart. é uma planta da família Combretaceae rica em triterpenos amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil, utilizada na medicina popular como agente antiinflamatório. Visando garantir a segurança e a eficácia de novos compostos antes de sugerir seu uso clínico, nesse estudo descrevemos o ensaio de toxicidade *in vivo* de CL-P2, um triterpeno semissintético obtido do triterpeno 3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno (CL-1), presente nas folhas de *Combretum leprosum* Mart., assim como o efeito antirreabsortivo de um hidrogel como sistema de liberação de CL-P2 no modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas. Através do protocolo de Toxicidade Oral Aguda (Procedimento Up and Down nº 425 – OECD) foi observado que o composto CL-P2 não apresentou toxicidade, conforme demonstrado pela ausência de mortalidade e de alterações significativas nos parâmetros bioquímicos de função renal e

hepática ao longo dos 14 dias de tratamento. No modelo de periodontite o hidrogel como sistema de liberação de CL-P2 reduziu a perda óssea alveolar, evidenciada pela análise morfométrica e histométrica, e aumentou os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO), considerada um marcador de formação óssea. Ainda avaliando a segurança, o uso do hidrogel não impactou negativamente a sobrevivência e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, sugerindo a segurança do composto sobre a saúde reprodutiva das camundongas.

Estudos indicam que agentes fitoterápicos podem representar alternativas promissoras no tratamento de doenças ósseas, como osteoartrose (Cró, 2017), osteoporose (Marques et al., 2016) e como adjuvantes no tratamento da periodontite (Srivastava *et al.*, 2022). De forma complementar, os triterpenos, uma classe de compostos naturais amplamente estudada, tem demonstrado diversas atividades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antitumorais (Im *et al.*, 2016). No entanto, um aspecto relevante para sua aplicação terapêutica é a avaliação de sua toxicidade. Estudos prévios indicam que muitos triterpenos apresentam baixa toxicidade em modelos experimentais, o que os torna promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (Porwal *et al.*, 2017). Ensaios *in vitro*, realizados em conformidade com as diretrizes da OCDE, confirmaram a ausência de potencial genotóxico de triterpenos (Sun *et al.*, 2021).

No presente estudo, o composto semissintético CL-P2 foi avaliado quanto à sua toxicidade em camundongos *Swiss* fêmeas. CL-P2 não causou mortalidade, perda de peso e nem alterações comportamentais significativas, exceto pela observação do comportamento de lambida e sonolência. Nossos dados estão em acordo com a literatura que aponta para a segurança dos triterpenos em modelos *in vivo* (Lima *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2015). Neste aspecto, nosso grupo de pesquisa observou que a administração de CL-P2 (10 mg/kg) durante 14 dias não causou alteração no peso corporal (Passos *et al.*, 2024). No entanto, outros autores analisando a toxicidade em camundongos do ácido bartogênico, um triterpeno com atividade anti-diabética, anti-inflamatória, anti-artrítica, anti-cancerígena e anti-tumoral, revelaram a ocorrência de morte com a dose de 100 mg/kg, enquanto doses menores (12,5, 25 e 50 mg/kg) foram bem toleradas (Dubey *et al.*, 2021). Ainda, embora no nosso estudo não tenha sido observado variação de massa ponderal entre os grupos, esses autores demonstraram que o ácido bartogênico foi associado com perda de peso tanto nos camundongos machos quanto fêmeas. Em acordo com esses dados, alguns autores sugerem o uso dos triterpenos no manejo da obesidade (Chen *et al.*, 2020). Outros autores investigando as ações de triterpenos sobre o comportamento demonstraram em camundongos que um triterpeno isolado de *Rubia cordifolia* Linn inibiu convulsões, locomoção, lambidas e induziu sono (Kasture et al., 2000).

No nosso estudo a análise bioquímica não revelou alterações nos níveis de creatinina, ALT e AST, indicando que o CL-P2 não compromete a função renal ou hepática, em conformidade com os achados de estudos anteriores sobre a baixa toxicidade de triterpenos (Moss & Whitby, 1975). Também em estudo do nosso grupo de pesquisa, a administração de CL-P2 (10 mg/kg) durante 14 dias não alterou os níveis de ALT/AST, além de ausência de alterações nos órgãos (fígado e rins) à análise histopatológica (Passos *et al.*, 2024). Neste sentido foi demonstrado que um triterpeno sintético melhorou a função renal em ratos diabéticos (Mkhwanazi *et al.*, 2019). Em ensaios *in vitro*, triterpenos mostraram atividade hepatoprotetoras significativas, baixando os níveis de ALT e AST (Zheng *et al.*, 2015). Alguns autores consideram os triterpenos como uma opção viável para a prevenção e tratamento de doenças hepáticas crônicas relacionadas com o metabolismo, cirrose e carcinoma hepatocelular (Sánchez-Crisóstomo *et al.*, 2019).

Ainda analisando a segurança, a saúde ovariana é um aspecto importante no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos, especialmente aqueles que podem influenciar a função reprodutiva. Pesquisas indicam que condições inflamatórias crônicas, como a periodontite, podem impactar negativamente a função ovariana, possivelmente comprometendo a fertilidade feminina ao alterar a foliculogênese e a ovulação (Pan *et al.*, 2019). Janglan *et al* (2024) observou em um estudo transversal que mulheres com diagnóstico de síndrome do ovário policístico (SOP) apresentavam pior saúde periodontal. De fato, um estudo correlacionando o papel da periodontite no equilíbrio da massa óssea em mulheres com SOP revelou níveis diminuídos de FAO nessas mulheres (Zia *et al.*, 2022).

Dentre as muitas atividades biológicas dos triterpenos incluem-se também potenciais efeitos sobre a saúde reprodutiva. No presente estudo, avaliando o efeito do tratamento com hidrogel contendo o triterpeno semissintético CL-P2 sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos ovarianos em camundongos *Swiss* fêmeas, observou-se que CL-P2 preservou a morfologia folicular e não causou alterações significativas na quantidade de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. A ausência de efeitos adversos sobre os folículos ovarianos sugere a segurança de CL-P2, destacando seu potencial no tratamento de doenças inflamatórias crônicas que podem afetar a saúde reprodutiva, como a periodontite. Nossos resultados estão em acordo com outros autores que sugerem efeitos benéficos dos triterpenos sobre o sistema reprodutor. Neste sentido, em um estudo para avaliar o efeito da administração do ácido ursólico (100, 300 ou 1000 mg/kg/d/15d) - um triterpeno presente em ervas, plantas e frutos e que tem sido de grande interesse no mundo médico há décadas - sobre o sistema reprodutor adulto e desenvolvimento fetal, foi demonstrado que ácido ursólico foi seguro para

a ratas grávidas e sua prole (Geerlofs *et al.*, 2020). Também foi demonstrado a eficácia dos triterpenos contra tumores hormônio-dependentes do sistema reprodutivo (Şoica *et al.*, 2021). Entretanto, os triterpenos possuem um perfil farmacocinético desfavorável em virtude de sua fraca solubilidade em água, o que pode afetar sua biodisponibilidade. No entanto, esse desafio na eficácia dos triterpenos pode ser superado através do desenvolvimento de derivados sintéticos ou semissintéticos, sendo essa última opção relativamente mais sustentável, com redução de resíduos ambientais.

Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes dos triterpenos chamam atenção para seu possível efeito sobre doenças que afetam o metabolismo ósseo. Sabendo que o osso é um órgão metabolicamente ativo que sofre constante remodelação ao longo da vida, sendo esse fenômeno regulado pela reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (Zhang *et al.*, 2021; Neumann *et al.*, 2016).

Uma das abordagens para a avaliação da saúde óssea envolve a análise da atividade dos osteoblastos, a qual pode ser mensurada por meio de marcadores específicos, como a fosfatase alcalina (FAO). A FAO é um dos principais marcadores bioquímicos da diferenciação e atividade osteoblástica, sendo amplamente utilizada para indicar a formação óssea. Os osteoblastos apresentam níveis elevados dessa enzima, e a quantificação da FAO reflete a taxa de formação óssea. Portanto, níveis elevados de FAO geralmente indicam uma alta atividade osteoblástica e um processo de formação óssea em andamento (Vimalraj *et al.*, 2020).

A medição dos níveis de FAO é útil em contextos clínicos, como no diagnóstico e monitoramento de doenças ósseas, sendo um parâmetro importante em estudos que investigam a saúde óssea e os efeitos de terapias que visam a regeneração ou a manutenção da massa óssea (Brown *et al.*, 2022).

Os produtos naturais têm sido usados há muito tempo tradicionalmente para prevenir e curar a perda óssea, com especial atenção aos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais. Nesse sentido, dados da literatura sugerem que os triterpenos podem modular o metabolismo ósseo (Porwal *et al.*, 2017). Neste sentido, o estudo de Park *et al.* (2021) demonstrou que um triterpeno isolado da casca da raiz de *Dictamnus dasycarpus*, usada na medicina tradicional como agente anti-inflamatório, promoveu a diferenciação de osteoblastos e a mineralização óssea, sendo o aumento da atividade da FAO um dos parâmetros analisados.

A saúde óssea é um dos principais objetivos na avaliação de compostos direcionados ao tratamento de condições inflamatórias, como a periodontite, uma doença caracterizada pela destruição progressiva do osso alveolar. No presente estudo, o hidrogel de CL-P2 reduziu significativamente a perda óssea alveolar, o que foi associado com aumento dos níveis séricos

de FAO, um marcador de formação óssea, além do aumento do nível inserção e menor comprometimento da área de furca, indicadores de melhora do osso alveolar. Esses achados estão em conformidade com a literatura existente, que sugere que triterpenos podem inibir a reabsorção óssea através do aumento da atividade osteoblastos (Park *et al.*, 2021). Dessa forma, o hidrogel de CL-P2 demonstra potencial terapêutico para o manejo da periodontite e outras condições que envolvem a reabsorção óssea, oferecendo uma abordagem eficaz para preservar a integridade do tecido ósseo.

Os ensaios pré-clínicos possuem suas limitações, e para esse estudo podemos elencar: avaliação de toxicidade *in vivo* foi realizada apenas através do protocolo de Toxicidade Oral Aguda. Embora o modelo de periodontite seja altamente reprodutível e amplamente utilizado para triagem de novas modalidades de tratamento, existem algumas limitações, incluindo: para além das diferenças anatômicas entre os molares de camundongos e humanos, a lesão mecânica provocada pela colocação da ligadura à volta dos dentes pode desencadear uma resposta inflamatória aguda e agravar o dano periodontal. Além disso, a colocação da ligadura promove o rápido início de uma microbiota disbiótica, que pode não representar o curso natural da disbiose oral observada durante o desenvolvimento da periodontite em seres humanos. A duração do tempo de tratamento (14 dias) pode ser insuficiente para detectar efeitos adversos.

Os pontos fortes do estudo incluem a utilização de um composto semissintético derivado de uma planta medicinal tradicionalmente empregada pela comunidade. Esta abordagem confere duplo valor à pesquisa, pois não apenas caracteriza uma rota mais sustentável de obtenção do composto, mas também se fundamenta em um conhecimento prévio que respalda seu uso. O fato do estudo combinar a avaliação da toxicidade *in vivo* do ativo com a investigação dos efeitos antirreabsortivos do hidrogel contendo o ativo, oferece uma análise integrada da segurança e eficácia do composto. O emprego do protocolo de Toxicidade Oral Aguda (Procedimento Up and Down nº 425 – OECD), seguindo diretrizes reconhecidas internacionalmente. A inclusão da FAO como marcador de formação óssea, sugerindo a atividade osteoblástica, permitindo uma avaliação direta da eficácia do tratamento. A avaliação da segurança do hidrogel em relação à saúde reprodutiva das camundongas, sugerindo que o composto não compromete o desenvolvimento ovariano.

Assim, a despeito das limitações do estudo, podemos concluir que CL-P2 demonstrou um perfil de segurança favorável, reduziu a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite em camundongas, com preservação da saúde reprodutiva, sugerindo que o hidrogel como sistema de liberação de CL-P2 pode representar uma abordagem inovadora no tratamento da periodontite.

CONCLUSÃO GERAL

Com base nas evidências discutidas, os resultados deste estudo mostraram que o hidrogel CL-P2 (10mg) tem um importante papel no metabolismo ósseo, e que o mesmo apresenta efeito osteoprotetor, pois previne a POA em camundongos *Swiss* fêmeas submetidos à PE, por meio de efeito antirreabsortivo, sugerindo que esse gel pode ser uma abordagem terapêutica interessante como adjuvante ao tratamento convencional da periodontite.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 394, n. 1-2, p. 49-54, 2013.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Dublin, v. 111, p. 383-95, 2007.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry Letters**, Londres, v. 10, p. xlviii–liii, 2014.
- BEZERRA, M. M. *et al.* Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Prevents Alveolar Bone Loss. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.
- BREYTENBACH, J. C.; MALAN, S. F. Pharmacochemical properties of Combretum zeyheri. **S. Afr. J. Sci.**, Johannesburg, v. 85, p. 372-74, 1989.
- CATON, J. G. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol.**, Copenhagen, v. 45, Suppl 20, p. S1-S8, jun. 2018.
- CHAVES, E.M.F. *et al.* Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 555-557, 2007.
- CHEN, J.; LEONG, P. K.; LEUNG, H. Y.; CHAN, W. M.; WONG, H. S.; KO, K. M. Biochemical mechanisms of the anti-obesity effect of a triterpenoid-enriched extract of *Cynomorium songaricum* in mice with high-fat-diet-induced obesity. **Phytomedicine**, v. 73, p. 153038, 2020.
- CHIBUZOR, J. V. et al. Preliminary Phytochemical, Antioxidative and Antibacterial Screening of Selected Medicinal Plants for Possible use in the Treatment of Bacterial Diseases. **Journal of Pharmaceutical Research International**, Hyderabad, v. 36, n. 1, p. 38-60, 2024.
- DE SOUZA MALTA, F. et al. Lithium chloride assuages bone loss in experimental periodontitis in estrogen-deficient rats. **Clin Oral Investig.**, Heidelberg, v. 24, n. 6, p. 2025-2036. doi: 10.1007/s00784-019-03067-9.
- DUBEY, V. K.; MADAN, S.; RAJPUT, S. K.; SINGH, A. T.; JAGGI, M.; MITTAL, A. K. Single and repeated dose (28 days) intravenous toxicity assessment of bartogenic acid (an active pentacyclic triterpenoid) isolated from *Barringtonia racemosa* (L.) fruits in mice. **Current Research in Toxicology**, v. 3, p. 100057, 2021.
- FARIAS, R. R. S. et al. Prospecção científica e tecnológica das espécies Combretum duartheanum Cambesse Combretum mellifluum Eichler. **Revista GEINTEC**. São Paulo, v. 5, n. 1, p.1606-1616, 2015.
- FISCHER, R. G.; GOMES FILHO, I. S.; CRUZ, S. S. D.; OLIVEIRA, V. B.; LIRA-JUNIOR, R.; SCANNAPIECO, F. A.; REGO, R. O. What is the future of Periodontal Medicine? **Braz**

Oral Res., São Paulo, v. 35, e102, 2021.

FREIRE, J. M. O. et al. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. **PLoS One**, San Francisco, v. 14, n. 11, e0223800, 2019.

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. **J Clin Periodontol.**, Copenhagen, v. 44, p. 94-105, 2017.

GEERLOFS, L.; HE, Z.; XIAO, S.; XIAO, Z. C. 15-Day subchronic developmental toxicity studies of ursolic acid in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 144, p. 111537, out. 2020

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 21, n. 7, p. 426-440, 2021.

HORINOUCI, C. D.; MENDES, D. A.; SOLEY, B. da S.; PIETROVSKI, E. F.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Combretum leprosum Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311-319, 2013.

IM, N. K.; LEE, D. S.; LEE, S. R.; JEONG, G. S. Lupeol isolated from *Sorbus commixta* suppresses $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -mediated osteoclast differentiation and bone loss in vitro and in vivo. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 79, n. 2, p. 412-20, 2016 Feb 26. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01088. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26878936.

JAGLAN, S.; TEWARI, S.; SINGHAL, S. R.; SHARMA, R. K. Impact of Polycystic Ovary Syndrome on Periodontal Status of Women of Adolescent and Adult Age Groups: A Cross-Sectional Study. **Medical Principles and Practice**, v. 33, n. 148-156, 2024.

KANEOKA, A. et al. Prevention of Healthcare-Associated Pneumonia with Oral Care in Individuals Without Mechanical Ventilation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v. 36, n. 8, p. 899-906, 2015.

KASTURE, V. S.; DESHMUKH, V. K.; CHOPDE, C. T. Anticonvulsant and behavioral actions of triterpene isolated from *Rubia cordifolia* Linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, n. 7, p. 675-680, jul. 2000.

KENWORTHY, R.; BAVEREL, M. Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 8, n. 4, p. 341-346, 1981.

KLAUSEN, B. Microbiological and Immunological Aspects of Experimental Periodontal Disease in Rats : **J Periodontol**, Chicago, 1991.

LICCARDRO, D. et al. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 20, n. 6, p. 1414, 2019.

LIMA, G. R. M. et al. Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 9142-9206, 2012.

LIN, P. et al. Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular

mechanism of periodontal disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 16, p. 8900, 2021.

MACHADO, V.; LOBO, S.; PROENÇA, L.; MENDES, J. J.; BOTELHO, J. Vitamin D and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 8, p. 2177, 2020.

MARINHO, I. V. et al. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, I, 2002. **Anais [...]** Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

MELO, I. M. et al. Calotropis procera latex protein reduces inflammation and bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. **Archives of Oral Biology**, Londres, v. 147, 2023.

MKHWANAZI, B. N.; VAN HEERDEN, F. R.; MAVONDO, G. A.; MABANDLA, M. V.; MUSABAYANE, C. T. Triterpene derivative improves the renal function of streptozotocin-induced diabetic rats: a follow-up study on maslinic acid. **Renal Failure**, v. 41, n. 1, p. 547-554, nov. 2019.

NEUMANN, E. et al. Adipokines in bone disease. **Nature Reviews Rheumatology**, Londres, v. 12, p. 296-302, 2016.

PASSOS, M. et al. Toxicologic profile and anti-nociceptive effect of two semi-synthetic triterpene derivatives from *Combretum leprosum* in mice. **BIOI**, v. 5, n. 1, 2024

PARK, K. R.; KIM, S.; CHO, M.; YUN, H.-M. Limonoid triterpene, obacunone increases runt-related transcription factor 2 to promote osteoblast differentiation and function. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, p. 2483, 2021.

PERES, M. A. et al. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet**, Londres, v. 394, n. 10194, p. 249-260, 2019.

PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, San Diego, v. 83, p. 90-99, 2006.

PINTO, I. R. et al. A semi-synthetic flavonoid from *Bauhinia pulchella* stem attenuates inflammatory osteolysis in periodontitis in rats: Impact on cytokine levels, oxidative stress, and RANK/RANKL/OPG pathway. **Archives of Oral Biology**, Londres, v. 117, 2020.

PORWAL, K. et al. Guava fruit extract and its triterpene constituents have osteoanabolic effect: Stimulation of osteoblast differentiation by activation of mitochondrial respiration via the Wnt/ β -catenin signaling. **Journal of Nutritional Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 22-34, 2017.

OLIVEIRA, S. H. P.; BRITO, V. G. B.; FRASNELLI, S. C. T.; RIBEIRO, B. da S.; FERREIRA, M. N.; QUEIROZ, D. P.; et al. Aliskiren attenuates the inflammatory response and wound healing process in diabetic mice with periodontal disease. **Frontiers in**

Pharmacology, v. 10, 2019.

RAVICHANDRAN, S.; BHARGAVI, K. M.; RAI, A.; PANDEY, T.; RAJPUT, J.; SRI, R. M. M. Medicinal plants for curing human diseases. **Insight - Chinese Medicine**, Hong Kong, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2023.

RICCI, E. et al. Periodontitis, female fertility and conception: a systematic review. **Biomedical Reports**, Atenas, v. 17, n. 86, 2022.

ROJAS, C. et al. Humanized mouse models for the study of periodontitis: an opportunity to elucidate unresolved aspects of its immunopathogenesis and analyze new immunotherapeutic strategies. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, p. 663328, 2021.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J periodont**, Chicago, p. 193-203, 1966.

SÁNCHEZ-CRISÓSTOMO, I. et al. Phytosterols and triterpenoids for prevention and treatment of metabolic-related liver diseases and hepatocellular carcinoma. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 197-214, 2019.

SINGH, L. J. et al. Medicinal plants as sources of terpenoids and their impact on Central Nervous System disorders: A review. **Journal of Phytopharmacology**, Hyderabad, v. 12, n. 2, p. 104-110, 2023.

ŞOICA, C. et al. Natural compounds in sex hormone-dependent cancers: the role of triterpenes as therapeutic agents. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, v. 11, p. 612396, 21 jan. 2021.

SRIVASTAVA, R. *et al.* Osteometabolism: Metabolic Alterations in Bone Pathologies. **Cells**, Basel, v. 11, 2022.

SUN, B.; HUANG, B.; SICA, V. P.; BAKER, T. R.; PFUHLER, S. A genotoxicity assessment approach for botanical materials demonstrated with *Poria cocos*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 156, p. 112521, out. 2021

TEIXEIRA, A. H. et al. *Stemodia maritima* L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 8, p. 988, 2017.

Trindade, D., Carvalho, R., Machado, V., Chambrone, L., Mendes, J. J., & Botelho, J. (2023). Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: a systematic review and meta - analysis of epidemiological studies. **Journal of Clinical Periodontology**, 50(5), 604-626. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13769>.

VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v. 754, p. 144855, 5 set. 2020.

VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; FACUNDO, V. A.; SAFFI, J. The natural triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxy-lup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces

apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2014.

VU, T. O.; TRAN, P. T.; SEO, W.; LEE, J. H.; MIN, B. S.; KIM, J. A. Triterpenoids from *Celastrus orbiculatus* Thunb. inhibit RANKL-induced osteoclast formation and bone resorption via c-Fos signaling. **Journal of Natural Medicines**, v. 75, n. 1, p. 56-65, jan. 2021.

XU, W. et al. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. **Adv Protein Chem Struct Biol**, San Diego, v. 120, p. 45-84, 2020.

ZHANG, X.; XU, M.; XUE, Q.; HE, Y. A modified method for constructing experimental rat periodontitis model. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 10, p. 2451, 2023.

ZHANG, Y. et al. Bone - Adipose Tissue Crosstalk: Role of Adipose Tissue Derived Extracellular Vesicles in Bone Diseases. **J Cell Physiol**, Hoboken, p.1-13, 2021.

ZHENG, Y. F. et al. Hepatoprotective triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza inflata*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6273-6283, 9 abr. 2015.

ZIA, A.; HAKIM, S.; KHAN, A. U.; BEY, A.; ATEEQ, H.; PARVEEN, S.; KHALID, S.; YUSUFI, F. Bone markers and bone mineral density associates with periodontitis in females with poly-cystic ovarian syndrome. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 40, n. 3, p. 487-497, maio 2022.

ANEXO A - REGIMENTO INTERNO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAPÍTULO V

DA DEFESA E DO PRODUTO FINAL

Art. 42 A dissertação de Mestrado deverá ser elaborada conforme as orientações do PPGCS. Não serão homologadas dissertações que não estiverem de acordo com as normas do PPGCS.

Art. 43 Para o processo de defesa do produto final, o discente deverá entregar formulário

assinado por seu orientador ao colegiado do PPGCS, contendo a data, o local, o título do trabalho, resumo do trabalho e o nome componentes da banca examinadora.

Ademais, deve entregar o

comprovante de submissão do artigo científico em revista científica com

Qualis CAPES mínimo B1 na área da Medicina II e ata de aprovação no exame de

qualificação. Para a defesa de dissertação, os pós-graduandos devem ter concluído todos os créditos. O estudante deverá entregar diretamente aos membros da banca as cópias impressas dos trabalhos, respeitando o prazo entre 30 e 15 dias antes da defesa de dissertação.

Art. 44 A banca examinadora para a defesa da dissertação deverá ser composta pelo orientador, coorientador (quando houver), um professor permanente do PPGCS (examinador interno) e um professor com título de doutor externo ao PPGCS (examinador externo); e dois membros suplentes, um pertencente ao PPGCS e outro externo.

Art. 45 O processo de defesa da dissertação de Mestrado será composto da abertura oficial pela Coordenação do PPGCS, condução da presidência dos trabalhos pelo orientador, apresentação expositiva do trabalho de defesa com duração de 40 a 50 minutos, arguição pelos membros da banca, julgamento e promulgação do resultado, oral e em ata. O formato preferencial da dissertação apresentará as seguintes seções: Introdução, Revisão de Literatura (estado da arte do tema em questão), Justificativa, Relevância, objetivos gerais e específicos e, por final, artigo científico formatado de acordo com periódico escolhido para submissão. As seções Introdução, Revisão de Literatura, Relevância, Justificativa, e Objetivos gerais e específicos.

deverão ser redigidas em português. Em caso de dissertações que originaram artigos científicos que serão submetidos a um periódico de língua inglesa, o artigo poderá constar na dissertação em língua inglesa, não sendo necessária sua tradução para o português.

Art. 46 O pós-graduando tem o prazo de 30 dias para entrega da dissertação após data de defesa, somente terá seu título de Mestre homologado se o mesmo cumprir todas as exigências legais do PPGCS e da UFC.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: “Efeito de dois compostos semi-sintéticos (CLP-2 e CLP-2a) derivados do triterpeno 3β,6β,16β-triidroxilup-20(29)-eno obtido das flores do *Combretum leprosum* Mart. em um ensaio pré-clínico de periodontite induzida por ligadura em camundongas”, registrado como Adendo nº 02/23 do Protocolo CEUA UFC Sobral nº 01/20, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino). O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado *ad referendum* pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Campus da UFC em Sobral, em cumprimento à deliberação registrada na oitava reunião ordinária de 15/08/2023.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07/04/2020 até 07/04/2022 (Projeto original) 07/04/2020 até 01/06/2024 (Adendo 01/22)
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	178 (cento e setenta e oito) (Projeto original) 332 (trezentos e trinta e dois no total, solicitados 154 adicionais neste adendo) (Adendo 01/22) 316 (trezentos e dezesseis) (Adendo 02/23)
Peso/Idade	22-25 g / 3 meses
Sexo	Fêmeas (♀)
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 30 de agosto de 2023.

Documento assinado digitalmente
 IGOR IUCO CASTRO DA SILVA
 Data: 30/08/2023 09:36:19-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 SIAPE: 1866173 - UFC Campus Sobral

ANEXO B – DECLARAÇÃO DE ACEITE CAPÍTULO DE LIVRO



DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros, revistas internacionais e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "Triterpenos e saúde óssea: potencial terapêutico de *Combretum leprosum* Mart. na periodontite" de autoria de "Erika Vanessa Farias dos Santos, Jordânia Marques de Oliveira Freire, Anderson Weiny Barbalho Silva, Alana Nogueira Godinho, Jair Mafezoli, Francisco Geraldo Barbosa, Hellíada Vasconcelos Chaves, José Roberto Viana Silva, Mirna Marques Bezerra Brayner, foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Health research: current challenges and future perspectives 4" a ser divulgado no mês de setembro de 2024

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabeno os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Ponta Grossa, 09 de agosto de 2024

Prof.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Doutora em ensino de ciência e tecnologia
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 97865
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533