

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**NATÁLIA LINHARES COUTINHO SILVA**

**ESTUDO DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS *N*-  
ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651 EM MODELO DE  
PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

RIO DE JANEIRO

2012

NATÁLIA LINHARES COUTINHO SILVA

ESTUDO DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS N-  
ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651 EM MODELO DE  
PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Volume único

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Luísa Palhares de Miranda

Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino

RIO DE JANEIRO

2012

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Silva, Natália Linhares Coutinho.

Estudo do Perfil Anti-inflamatório dos Derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 em Modelo de Periodontite Experimental em Ratos / Natália Linhares Coutinho Silva – 2012.

81 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadores: Ana Luísa Palhares de Miranda; Jorge Luiz Mendonça Tributino.

1. Periodontite 2. Perfil anti-inflamatório

3. Derivados *N*-acilidrazônicos 4. LASSBio-930

5. LASSBio-651.

I. MIRANDA, A. L. P.; TRIBUTINO, J. L. M.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro; Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia – UFRJ.

III. Título.

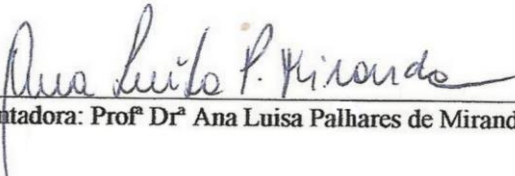
## FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Linhares Coutinho Silva

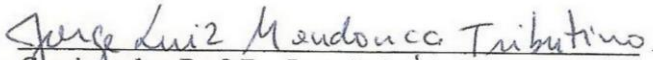
### ESTUDO DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651 EM MODELO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas.

Aprovada em 31 de outubro de 2012.

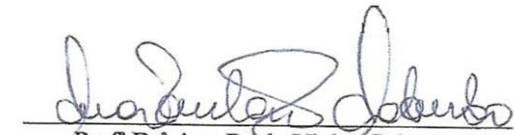


Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Luisa Palhares de Miranda

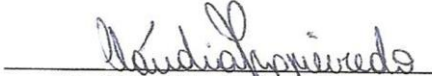


Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino

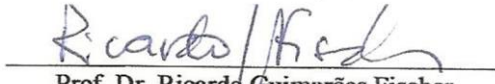
Banca examinadora:



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Paula Vieira Colombo



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cláudia Rinto Figueiredo



Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais um sonho conquistado.

A Santa Apolônia de Alexandria, padroeira dos dentistas, a quem pedi com fé que guiasse meus conhecimentos de farmacêutica.

Aos meus orientadores Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Luísa Palhares de Miranda e Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino, pela confiança, amizade, compreensão e carinho. Por estarem sempre presentes nas discussões ao longo da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eliezer Barreiro, coordenador científico do LASSBio.

Aos professores do LASSBio pelas contribuições: Prof. Dr. Carlos Alberto Mansour Fraga, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lídia Moreira Lima e Prof. Dr. Carlos Alberto Santanna.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabriela Camargo, da Faculdade de Odontologia – UFF, por ter se disponibilizado a ensinar o modelo da ligadura e pelas radiografias.

Ao Dr. Rodolfo do Couto Maia pela síntese de LASSBio-930 e ao mestre Fernando Rodrigues pela síntese de LASSBio-651.

Aos meus amigos de laboratório por nossas discussões científicas e não científicas (rs!). Aos doutorandos Bruna Roedel, Cleverton Kleiton Lima, Ewerton Portela e, em especial, Leandro Louback, com quem aprendi muito muito muito sobre laboratório, sempre disposto a escutar minhas dúvidas, sempre com perguntas inquietantes, sempre ajudando no que fosse preciso. A mestra Simone Rocha, companhia de muitos finais de semana... e aos mestrandos Celimar Silva e Clemilson Junior, pelo ótimo convívio diário. As alunas de IC: Rafaela Vieira, que me ajudou a beça no início do trabalho a amarrar o dente dos ratinhos e sempre esteve disposta a ajudar no que fosse preciso, por sempre oferecer um abraço carinhoso, um sorriso feliz e companhia pra que eu pudesse conhecer a Ilha do Governador; a Bárbara Ramos, Mariana Soares e Mariana Porto, minhas dedicadas alunas que sempre me ajudaram imensamente trocando o ácido nítrico, preparando soluções, *scaneando* mandíbulas e radiografias..., a quem eu ensinei com carinho o protocolo da periodontite e hoje me orgulho em vê-las repassando o que aprenderam; a Mariana Giorgi, sempre alegre e prestativa.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Grillo, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Abrahão e a técnica de laboratório Arminda Mendes, do departamento de Patologia e Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia – UFRJ, por terem abraçado nosso projeto auxiliando com todo o processamento e análise histológica.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Domingos e Prof. Dr. Fábio Guedes, do departamento de radiologia, Faculdade de Odontologia – UFRJ, pelas radiografias.

Aos meus pais, Humberto Coutinho e Cátia Linhares, pelo apoio, pela compreensão nos momentos em que não pude estar em casa, por sempre terem incentivado e priorizado a educação... meus orientadores de vida!

A minha irmã, Isabela Linhares, pelo carinho, pela torcida e pelas risadas que me proporciona sempre... por me ajudar fazendo os favores mais feios e chatos (rs!), por me ajudar com a adaptação de algumas figuras.

Ao amigo (que foi mais que amigo... rs!) Michel Guia pela companhia nas idas e vindas nos finais de semana, pela atenção, apoio e compreensão durante a maior parte desta trajetória... pela ajudinha com a adaptação de algumas figuras e com o sumário. A dona Vanda e dona Zilda pelo carinho de sempre.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim e perdoaram todas as vezes em que eu estive ausente: Priscila Castro, Raíssa Dutra, Juliana Ramos, Gisele São Pedro, Stefanie Menzel e, especialmente, Victor Holanda, pelos dois meses de estudos que direcionou indiretamente nosso futuro... pela companhia no msn durante a elaboração da dissertação. Ao amigo João Junior, pelos momentos de descontração com quadrinhos do facebook!

Aos meus avós (vó Maria, vó Deolinda e vô Sussuca) pela torcida.

A doutoranda Bianca W. Lobo, pela amizade e pelo incentivo.

As doutorandas (e dentistas!!) Cristine Amaral e Édila por me ajudarem sempre que surgia uma dúvida de periodontia.

Ao doutorando Pedro Perdigão, pelas fotos com a “super câmera”; ao Prof. Dr. Newton Castro, pela ajuda com a estatística; a todos os colegas e professores do Laboratório de Farmacologia Molecular, pelas contribuições prestadas ao trabalho, pelo agradável convívio.

Aos colegas da síntese e modelagem do LASSBio.

A Josi Calixto, nossa bioterista, pelo trabalho, pela alegria e pelos empadões nos momentos festivos.

Aos meus dentistas, Dr. José Carlos Damasio de Santanna e Dr. Marcos André Santanna, por terem acompanhado toda a minha trajetória desde a graduação, pela compreensão por tantas consultas remarcadas por conta dos experimentos (rs!).

A banca de acompanhamento, Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yraima Moura Lopes Cordeiro.

A banca examinadora pelo aceite do convite.

Aos órgãos de fomento: CAPES, FAPERJ, INCT-INOVAR.

“Não sei o que o mundo dirá de minha obra. A mim, parece que nunca acabei de ser criança. Uma criança que brincou na praia, que encontrou uma pedra bem polida, uma concha multicolorida, enquanto o grande oceano da verdade continua a se estender, ainda inexplorado, diante de meus olhos.”

Isaac Newton

## RESUMO

SILVA, Natália Linhares Coutinho. **Estudo do Perfil Anti-inflamatório dos Derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 em Modelo de Periodontite Experimental em Ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos que revestem e envolvem o dente e resulta de interações entre espécies específicas da microbiota subgengival e um hospedeiro suscetível, levando a liberação de citocinas, quimiocinas e prostanoídes, como a prostaglandina  $E_2$ . A produção exacerbada destes mediadores leva à destruição tecidual e à ativação de vias de reabsorção óssea, portanto a modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro como base para a terapia da doença tem sido estudada. No presente trabalho foi implantado um modelo de periodontite experimental em ratos bem estabelecido na literatura, através da ligadura do primeiro molar mandibular, no qual foi avaliado o perfil anti-inflamatório de dois derivados *N*-acilidrazônicos protótipos de candidatos à fármacos, planejados e sintetizados no LASSBio: LASSBio-930 e LASSBio-651, previamente caracterizados por nosso grupo através de estudos *in vitro* e em modelos animais clássicos de inflamação. Os derivados (100  $\mu\text{mol/kg/dia}$ , administrados após a doença estabelecida) inibiram a perda óssea alveolar em 58,4% e 65,3%, respectivamente. A análise histológica demonstrou maior preservação dos tecidos periodontais e infiltrado inflamatório moderado, em comparação ao grupo controle. As dosagens de mieloperoxidase a partir do tecido gengival indicaram que os compostos possivelmente impediram a migração de neutrófilos para o tecido. Apenas o derivado LASSBio-930 reduziu as concentrações de  $\text{PGE}_2$  dosadas do tecido gengival. Os efeitos observados provavelmente são resultantes da modulação da resposta inflamatória através da inibição não seletiva da COX pelo derivado LASSBio-930, e inibição de COX/TNF- $\alpha$  por LASSBio-651. Além dessas atividades, o tratamento crônico dos animais com os derivados LASSBio-930 e LASSBio-651 não apresentou sinais de gastroirritação, sendo protótipos de candidatos a fármacos úteis como adjuvantes no tratamento da doença periodontal.



## ABSTRACT

SILVA, Natália Linhares Coutinho. **Estudo do Perfil Anti-inflamatório dos Derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 em Modelo de Periodontite Experimental em Ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Periodontitis is an inflammatory disease of the tissues that cover and surround the teeth and result of interactions between specific species of the subgingival microbiota and a susceptible host, leading to the release of cytokines, chemokines and prostanoids, such as prostaglandin E<sub>2</sub>. The exacerbated production of these mediators leads to tissue destruction and the activation of bone resorption pathways, so the modulation of immunoinflammatory response in the host as a base to therapy for the disease has been studied. In the present study, we implemented a well-established model of experimental periodontitis in rats, induced by a ligature placed around the first molar mandibular, in which we evaluated the anti-inflammatory profile of two *N*-acylidrazonics derivates. These prototype drug candidates, designed and synthesized in LASSBio: LASSBio-930 and LASSBio-651, were previously characterized by our group using *in vitro* and classical animal models of inflammation. The derivates (100 µmol/kg /day administered after established disease) inhibited alveolar bone loss in 58.4% and 65.3%, respectively. Histological analysis showed greater preservation of periodontal tissues and moderate inflammatory infiltrated, compared to the control group. Dosages of myeloperoxidase from the gingival tissue indicated that the compounds possibly prevented neutrophil migration into the tissue. Only the compound LASSBio-930 reduced the PGE<sub>2</sub> levels in gingival tissue. These observed effects occurs probably due to the modulation of the inflammatory response by non selective COX inhibition by LASSBio 930, and COX/TNF-α inhibition by LASSBio-651. Besides these activities, the chronic treatment of animals with the derivates LASSBio-930 and LASSBio-651 showed no signs of gastric irritation, being a promising prototype drug candidates to adjuvant treatment of periodontal disease.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 PERIODONTO.....	1
1.2 DOENÇAS PERIODONTAIS.....	3
1.3 O PAPEL DOS MICRO-ORGANISMOS NA DOENÇA PERIODONTAL .....	5
1.3.1 OS COMPLEXOS MICROBIANOS .....	8
1.4 A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE AO DESAFIO BACTERIANO.....	10
1.4.1 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NA DOENÇA PERIODONTAL.....	10
1.4.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E REABSORÇÃO ÓSSEA.....	12
1.4.2.1 CITOCINAS .....	12
1.4.2.2 PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> .....	14
1.4.2.3 EIXO RANK-RANKL-OPG .....	16
1.4.3 PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E ADAPTATIVO..	18
1.4.3.1 CÉLULAS RESIDENTES .....	18
1.4.3.2 CÉLULAS NÃO RESIDENTES .....	19
1.4.3.2.1 NEUTRÓFILOS NAS DOENÇAS PERIODONTAIS .....	19
1.4.3.2.2 LINFÓCITOS NAS DOENÇAS PERIODONTAIS .....	21
1.5 TERAPIAS NÃO-CIRÚRGICAS NO MANEJO DA PERIODONTITE.....	22
<b>2JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>24</b>
1.6 OS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>246</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 REAGENTES E SOLVENTES .....	27
3.2 KIT DE DOSAGENS .....	28
3.3 SOLUÇÕES .....	28

3.4 METODOLOGIAS EMPREGADAS .....	30
3.4.1 ANIMAIS E ÉTICA .....	30
3.4.2 PROTOCOLO DE PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS .....	30
3.4.3 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR: MÉTODO MACROSCÓPICO .....	33
3.4.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS A PARTIR DO TECIDO GENGIVAL .....	34
3.4.4.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	34
3.4.4.2 DOSAGEM DE PGE <sub>2</sub> DO TECIDO GENGIVAL .....	35
3.4.4.3 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE DO TECIDO GENGIVAL .....	35
3.4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS .....	36
3.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>378</b>
4.1 PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: ESTUDO DOS DERIVADOS N- ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651 .....	38
4.1.1 AVALIAÇÃO DO PESO E ASPECTOS GERAIS DOS ANIMAIS.....	38
4.1.2 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR .....	39
4.1.3 DOSAGENS BIOQUÍMICAS A PARTIR DO TECIDO GENGIVAL .....	41
4.1.3.1 PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> .....	41
4.1.3.2 MIELOPEROXIDASE .....	41
4.1.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS PERIODONTAIS.....	42
4.1.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ESTÔMAGOS .....	43
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>455</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>522</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>533</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do periodonto.....	1
Figura 2 – Relação dos tecidos gengivais com o dente e osso alveolar.....	3
Figura 3 – Diferenças entre o periodonto sadio e doente.....	4
Figura 4 – Modelo linear de acometimento das doenças periodontais.....	6
Figura 5 – Modelo experimental de gengivite.....	6
Figura 6 – Evolução do modelo conceitual do início e progressão da doença periodontal.....	7
Figura 7 – Modelo não-linear proposto na década de 90.....	7
Figura 8 – Diagrama de associação de espécies na placa subgengival.....	8
Figura 9 – Ativação dos TLRs e IL-1Rc.....	12
Figura 10 – Via de síntese dos prostanoídes.....	14
Figura 11 – Eixo RANK-RANKL-OPG.....	17
Figura 12 – Fagocitose e atividade microbicida dos neutrófilos.....	20
Figura 13 – Neutrófilos na bolsa periodontal formando uma parede contra o biofilme.....	20
Figura 14 – Participação das células residentes e não residentes em resposta à ativação de receptores do tipo Toll.....	22
Figura 15 – Estrutura dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.....	24
Figura 16 – Estrutura dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651.....	25
Figura 17 – Periodontite experimental em ratos induzida por ligadura.....	31
Figura 18 – Desenho experimental.....	32
Figura 19 – Mandíbula de rato sacrificado após 11 dias da colocação da ligadura.....	33

<b>Figura 20 – Análise de perda óssea pelo método macroscópico.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 21 – Fluxograma de dosagens padronizado.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 22 – Obtenção de lâminas para análise histopatológicas.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 23 – Representação das regiões mesial, de furca e distal do 1° molar mandibular.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 24 – Imagens representativas da análise macroscópica de perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 25 – Cortes histológicos longitudinais a partir da hemi-mandíbula esquerda dos animais.....</b>	<b>44</b>

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1 – Peso dos animais nos dias 0, 5, 7, 9 e 11.....</b>	<b>38</b>
<b>Gráfico 2 – Perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular.....</b>	<b>39</b>
<b>Gráfico 3 – Prostaglandina E<sub>2</sub> no tecido gengival.....</b>	<b>41</b>
<b>Gráfico 4 – Mieloperoxidase no tecido gengival.....</b>	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroidais  
COX – Ciclo-oxigenase  
D.O. – Densidade ótica  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EDTA – Ácido etilen-diamino-tetra-acético  
FCG – Fluido crevicular gengival  
HTAB – Hexadeciltrimetil amônio  
ICAM-1 – Moléculas de adesão intercelular 1  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IgG – Imunoglobulina G  
IKK – Inibidor do fator nuclear kappa B  
IL-1 – Interleucina-1  
IL-10 – Interleucina-10  
IL-11 – Interleucina-11  
IL-12 – Interleucina-12  
IL-17 – Interleucina-17  
IL-1Rc – Receptores de IL-1  
IL-4 – Interleucina-4  
IL-6 – Interleucina-6  
IL-8 – Interleucina-8  
IRAK – Receptor de Interleucina-1 associado à quinase  
IRF – Fator regulador de Interferon  
JAK – Janus quinases  
JCE – Junção cimento-esmalte  
JNK – Quinase c-Jun N-terminal  
LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MAPK p8 – Proteínas quinases ativadas por mitógenos p38  
MMP – Metaloproteinases de matriz  
MPO – Mieloperoxidase  
MyD88 – Fator de diferenciação mieloide 88  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

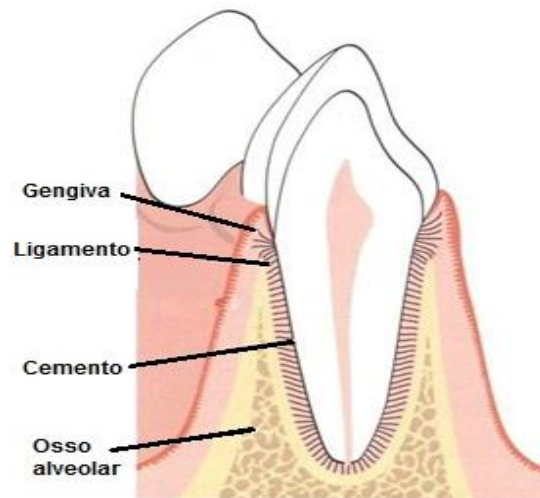
NETs – Armadilhas extracelulares neutrofílicas  
NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa B  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPG – Osteoprotegerina  
PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos  
PBS – Tampão fosfato salina  
PGD<sub>2</sub> – Prostaglandina D<sub>2</sub>  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  – Prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
PGs – Prostaglandinas  
PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PMN – Polimorfonucleares  
RANK – Receptor do ativador do fator nuclear kappa B  
RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B  
STATs – Transdutores de sinal e ativadores de transcrição  
TAK-1 – Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador beta  
TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador beta  
Th1 – Linfócitos T auxiliares 1  
Th17 – Linfócitos T auxiliares 17  
Th2 – Linfócitos T auxiliares 2  
TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz  
TIR – Receptor Toll-Interleucina 1  
TIRAP – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR  
TLRs – Receptores do Tipo Toll  
TMB – Tetrametilbenzidina  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
TNF- $\beta$  – Fator de necrose tumoral beta  
TRAF-3 – Receptor de fator de necrose tumoral associado ao fator 3  
TRAF-6 – Receptor de fator de necrose tumoral associado ao fator 6  
TRAM – Molécula adaptadora relacionada ao TRIF  
TRIF – Domínio TIR contendo contendo adaptador do indutor de interferon beta  
TXA<sub>2</sub> – Tromboxana A<sub>2</sub>  
V.o. – Via oral  
VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PERIODONTO

O periodonto (peri-: ao redor; -odonto: dente) compreende os seguintes tecidos: cemento, ligamento periodontal, osso alveolar e gengiva (Figura 1). Este conjunto de tecidos reveste e envolve o dente, sendo de fundamental importância para a sua fixação e sustentação nos ossos maxilar e mandibular (LINDHE *et al.*, 2010).



**Figura 1 – Representação do periodonto** (Adaptado de LINDHE *et al.*, 2010).

Cada um destes componentes do periodonto diferem-se por sua localização, arquitetura tecidual, composição bioquímica e celular, no entanto, juntos, funcionam como uma unidade (BARTOLD *et al.*, 2000).

O cemento é um tecido conjuntivo duro, avascular e não possui terminações nervosas. Recobre as raízes dos dentes e insere as fibras do ligamento periodontal, além de contribuir para o processo de reparo em casos de defeitos de reabsorção e fraturas radiculares. A composição do cemento assemelha-se ao osso, contém 50% de minerais (como o fosfato de cálcio, denominado hidroxiapatita, e traços de íons magnésio, carbonato e fluoreto, por exemplo) e 50% de matriz orgânica, na qual predomina o colágeno tipo I (NANCI & BOSSHARDT, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2010).

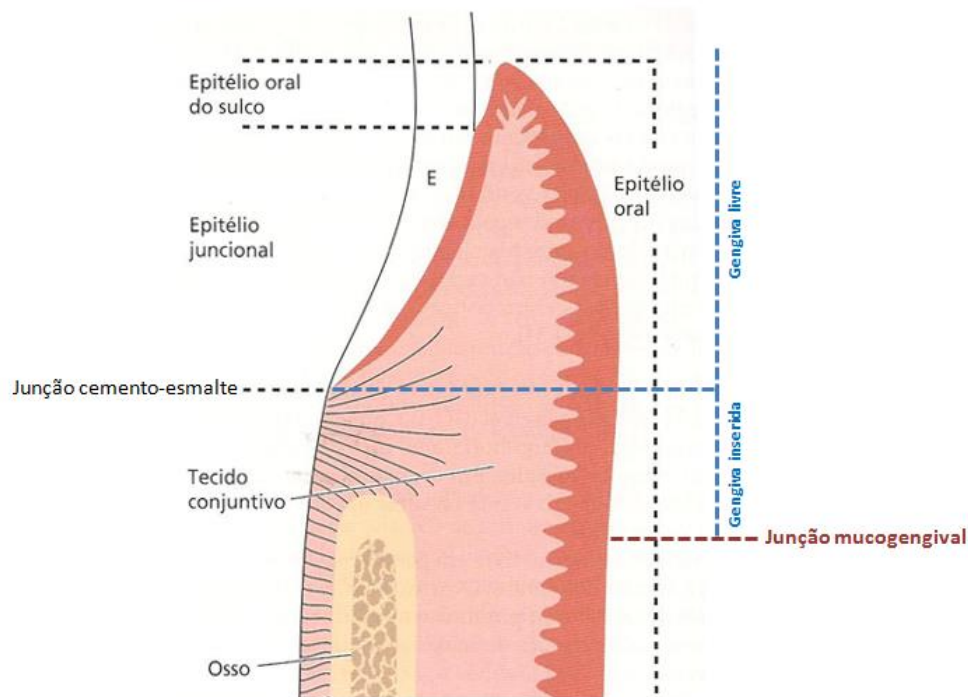
O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, situado entre o cemento e o osso alveolar. É constituído de células (principalmente fibroblastos) e de um compartimento extracelular, compreendendo constituintes colágenos e não colágenos de matriz (proteoglicanas, glicoproteínas e fosfatase

alcalina), todos embebidos por uma substância fundamental, constituída por aproximadamente 70% de água, permitindo a habilidade do dente em suportar as cargas de estresse (CARRANZA & BERNARD, 2012; WADA *et al.*, 2009).

O osso alveolar é um componente dos ossos da mandíbula e do maxilar especializado no suporte do dente. A parede alveolar ao redor de toda a raiz do dente é conhecida por sua capacidade de remodelamento contínuo e rápido em resposta ao desafio metabólico ou ao carregamento funcional imposto pela mastigação, um diferencial em relação a outros sítios esqueléticos. O osso alveolar é composto por um osso fasciculado, ou seja, fornece inserções para os feixes de fibras do ligamento periodontal, e é constituído por células osteogênicas e componentes de matriz, principalmente fibras colágenas, predominando as do tipo I (SAFFAR *et al.*, 1997; SODEK & MCKEE, 2000).

A gengiva compreende os componentes epiteliais e do tecido conjuntivo. O epitélio é dividido em três compartimentos funcionais – epitélio gengival ou epitélio oral (voltado para a cavidade oral), epitélio sulcular ou epitélio oral do sulco (voltado para o dente, sem contato com a superfície do mesmo) e epitélio juncional (que permite o contato da gengiva e o dente) – e o tecido conjuntivo em compartimentos superficial e profundo (Figura 2) (NANCI & BOSSHARDT, 2006).

Macroscopicamente, pode ser diferenciada em gengiva livre, que se posiciona até o nível correspondente à junção cimento-esmalte (JCE), e gengiva inserida, demarcada pela junção mucogengival na direção apical. A margem gengival livre é arredondada, formando uma pequena invaginação entre o dente e a gengiva; quando uma sonda periodontal é inserida nesta invaginação e forçada na direção da JCE, o tecido gengival é separado do dente e uma bolsa ou sulco gengival fica aberta artificialmente (LINDHE *et al.*, 2010).



**Figura 2 – Relação dos tecidos gengivais com o dente e osso alveolar.** Em azul, delimitação macroscópica da porção gengival livre e inserida (Adaptado de LINDHE *et al.*, 2010).

## 1.2 DOENÇAS PERIODONTAIS

As doenças periodontais representam um grupo de infecções que acometem os tecidos do periodonto, podendo ser classificadas em gengivites, se o processo for restrito ao tecido gengival, e periodontites, quando ocorre perda de inserção clinicamente detectável (ACADEMIA AMERICANA DE PERIODONTIA, 1999).

A gengivite é considerada um fator de risco para a periodontite e caracteriza-se por vermelhidão, edema e sangramento gengival à sondagem ou durante a escovação; consiste em uma condição inflamatória reversível e resulta do acúmulo de placa bacteriana (LANG *et al.*, 2009).

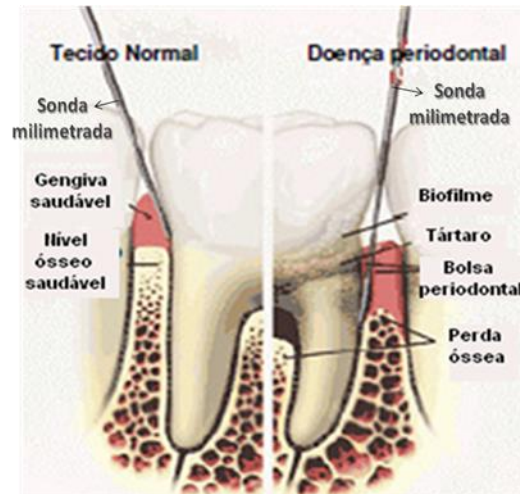
A periodontite é definida como “uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por micro-organismos específicos ou grupos de micro-organismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar, com formação de bolsa, retração, ou ambas” (HINRICHS & NOVAK, 2012).

A perda dos tecidos do periodonto é avaliada por meio de medidas da profundidade de bolsas periodontais (distância entre a margem gengival até o fundo da bolsa periodontal) e dos níveis clínicos de inserção (distância entre a JCE e o fundo da bolsa periodontal), realizadas em diferentes sítios ao redor do dente com o

auxílio da sonda periodontal milimetrada. Ainda compõem o exame de condição periodontal a avaliação radiográfica de perda do osso alveolar e a avaliação clínica da inflamação dos tecidos, através da observação de sangramento à sondagem (índice de sangramento sulcular gengival), inspeção visual de cor, textura e edema da gengiva (índice gengival) e presença de placa bacteriana na superfície dental (índice de placa) (SALVI *et al.*, 2010; BUDUNELI & KINANE, 2011).

Embora exista uma falta de uniformidade nas definições dos diferentes graus de acometimento da doença, quando a periodontite afeta até 30% dos sítios é considerada localizada, ou, acima de 30% dos sítios, generalizada. Pode ainda ser considerada leve, moderada ou grave, de acordo com a gravidade (ARMITAGE, 1999).

No peridonto clinicamente sadio não há bolsa, pois a gengiva está em contato íntimo com a superfície do esmalte do dente. Existe apenas um sulco gengival, com profundidade de sondagem inferior ou igual a 3 milímetros (mm). Quando a distância entre a margem gengival e o fundo da bolsa ultrapassa 3 mm, houve perda dos tecidos de suporte do dente, formando a bolsa periodontal (Figura 3) (LINDHE *et al.*, 2010).



**Figura 3 – Diferenças entre o periodonto sadio e doente** (Adaptado da Academia Americana de Periodontia. Disponível em: <http://www.perio.org/consumer/2a.html>. Acesso em: 03/07/2012).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos e a Academia Americana de Periodontia definem a periodontite moderada quando dois ou mais sítios interproximais apresentam perda de inserção maior ou igual a 4 mm, não sendo no mesmo dente; ou quando dois ou mais sítios interproximais apresentam bolsas com profundidade maior ou igual que 5 mm, não sendo no mesmo dente (PRESHAW, 2009).

A periodontite grave caracteriza-se por dois ou mais sítios interproximais com perda de inserção maior ou igual a 6 mm, não sendo no mesmo dente, e pelo menos um sítio interproximal com bolsa de profundidade maior ou igual a 5 mm (PRESHAW, 2009). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 15-20% da população mundial adulta (entre 35-44 anos) apresenta periodontite na forma grave (OMS, 2012).

No Brasil, com o objetivo de produzir informações acerca das condições de saúde bucal da população brasileira e subsidiar o planejamento de ações nessa área nos diferentes níveis de gestão do Sistema Único de Saúde, foi iniciada a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Dados publicados referentes ao levantamento realizado no ano de 2010 demonstraram que 15,2% e 4,2% da população adulta (35-44 anos) apresentavam bolsas periodontais rasas (3-5 mm de profundidade) e profundas (acima de 6 mm), respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A periodontite crônica é caracterizada pela progressão lenta da doença, embora alguns pacientes apresentem curtos períodos de exacerbação. Em casos onde ocorre rápida progressão, a periodontite é considerada agressiva e os pacientes geralmente apresentam aspecto de saúde periodontal e a quantidade de deposição microbiana é incompatível com a gravidade da destruição do periodonto. Existem ainda as doenças periodontais necrosantes, divididas em gengivite e periodontite ulcerativa necrosante, caracterizadas por um processo agudo de dor, necrose e sangramento gengival, geralmente associadas às condições sistêmicas, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (ARMITAGE, 1999).

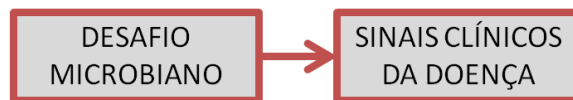
### 1.3 O PAPEL DOS MICRO-ORGANISMOS NA DOENÇA PERIODONTAL

No início do século 20, durante a chamada “era de ouro da microbiologia”, os métodos disponíveis à época levaram os microbiologistas a acreditar que certos micro-organismos (como amebas, espiroquetas, fusiformes e estreptococos) eram os possíveis agentes etiológicos da doença periodontal. No entanto, a cada década mais informações acerca da relação destas bactérias com a doença se mostravam duvidosas (SOCRANSKY & HAFAJEE, 1992; HAFAJEE & SOCRANSKY, 1994a).

Entre os anos de 1920 e 1940, a doença periodontal foi atribuída a defeitos inerentes aos pacientes, como trauma de oclusão, atrofia por desuso ou a combinação destes fatores, enquanto a bactéria era considerada secundária neste processo. No entanto, o tratamento dos pacientes baseado nestas hipóteses não era

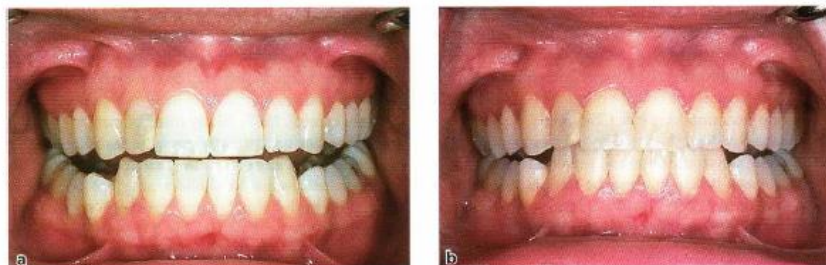
efetivo no controle da doença periodontal. No final da década de 50, o papel das bactérias voltou a ser enfatizado, mas como agentes causadores não específicos (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994a; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994b).

Estudos em animais durante os anos 60 retomam o interesse na especificidade da etiologia microbiana. No entanto, nesta década, a ênfase era para o controle mecânico do acúmulo de placa, aceitava-se comumente que o desafio microbiano era de alguma forma associada à doença periodontal em humanos (Figura 4) (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994a).



**Figura 4 – Modelo linear de acometimento das doenças periodontais.** Na década de 60 surge o consenso do papel etiológico das bactérias para o início e progressão da doença periodontal (Adaptado de KORNMAN, 2008).

O estudo clássico “gingivite experimental” realizado por Løe e colaboradores (1965) enfatizou a importância da formação da placa bacteriana no desenvolvimento da doença periodontal. Indivíduos inicialmente com o periodonto sadio, após 21 dias sem higienização oral, desenvolveram gengivite (Figura 5). A doença foi revertida após tratamento adequado e re-establishimento das práticas de higiene.

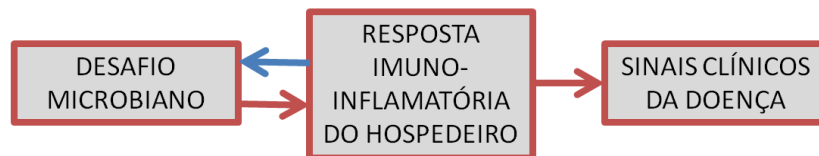


**Figura 5 – Modelo experimental de gengivite:** a) Voluntário periodonto clinicamente sadio no início do experimento; b) O mesmo voluntário após 21 dias sem higienização oral, culminando no depósito de placa sobre os dentes e inflamação gengival marginal generalizada (LINDHE *et al.*, 2010).

Até o início dos anos 70, acreditava-se que a composição da placa fosse similar de paciente para paciente e de sítio para sítio. No entanto, após estudos de periodontite agressiva localizada, a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi considerada como possível patógeno na doença. Do mesmo modo o papel de *Porphyromonas gingivalis* como patógeno foi sugerido em casos de periodontite crônica (SOCRANSKY & HAFAJEE, 1992; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994b).

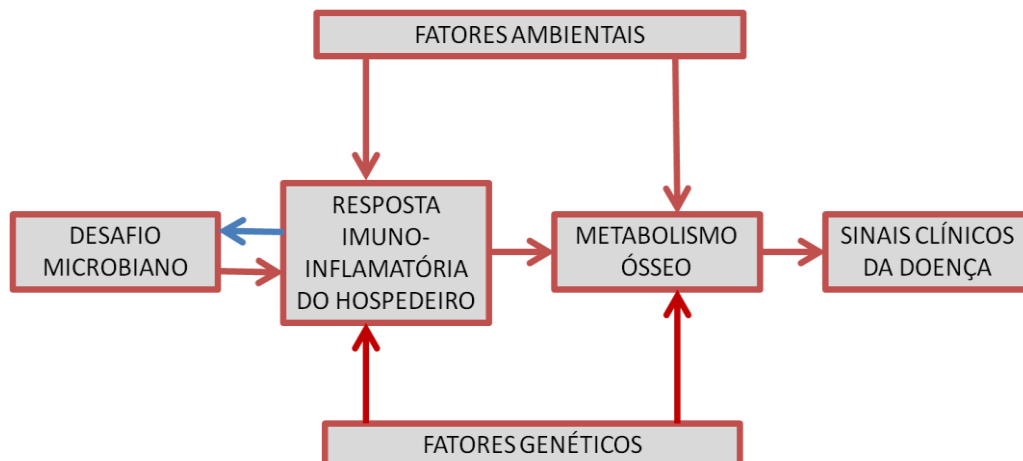
Além disso, observações epidemiológicas indicavam que apenas alguns indivíduos ou sítios apresentavam perda de inserção. Da mesma forma, algumas populações (como no Sri Lanka e Quênia) apresentavam quantidades consideráveis de cálculo e placa com pequena ou nenhuma perda de inserção (LÖE *et al.*, 1986; BAELUM *et al.*, 1988).

A especificidade retornou como um conceito fundamental na etiologia das doenças periodontais; a forma de como a patogênese da doença periodontal era estudada também se modificou: o foco não era apenas para que se compreendesse a formação das bolsas periodontais, mas também para o estudo de células, enzimas e mediadores envolvidos que pudessem explicar a resposta do hospedeiro na progressão da periodontite (Figura 6) (WILLIAMS, 2008).



**Figura 6 – Evolução do modelo conceitual do início e progressão da doença periodontal.** O papel central da resposta imunoinflamatória do hospedeiro em resposta ao desafio microbiano caracteriza o modelo proposto nos anos 70 (Adaptado de KORNMAN, 2008).

Nos anos 90 foi proposto um modelo não-linear, no qual estão inseridos fatores ambientais e genéticos como modificadores da resposta do hospedeiro ao desafio microbiano. O novo modelo torna mais evidente que a presença da bactéria patogênica não leva automaticamente à resposta do hospedeiro e consequente destruição (Figura 7) (PAGE & KORNMAN, 1997). Os patógenos são necessários, mas não são suficientes para resultar na doença periodontal (SOCRANSKY & HAJAJEE, 1992).



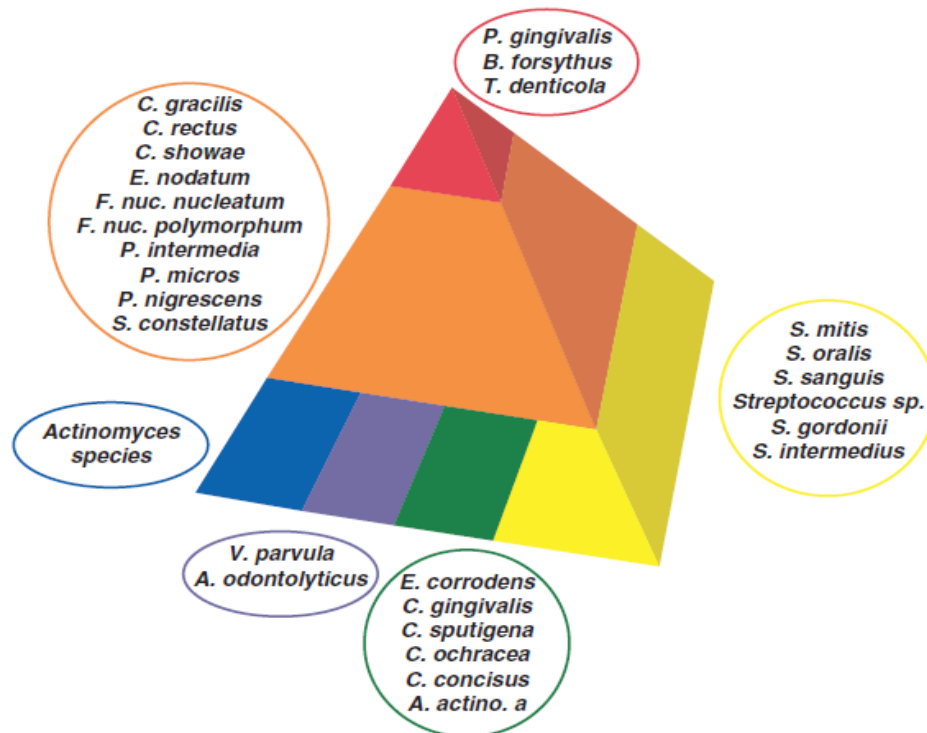
**Figura 7 – Modelo não-linear proposto na década de 90.** Fatores ambientais e genéticos podem contribuir para a patogênese da periodontite (Adaptado de PAGE & KORNMAN, 1997).

### 1.3.1 OS COMPLEXOS MICROBIANOS

A técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* utiliza sondas de DNA para detecção de micro-organismos que compõem os biofilmes bucais, o que viabiliza estudos de grande porte em Periodontia (SOCRANSKY *et al.*, 1994).

Utilizando esta técnica, Socransky e colaboradores (1998) analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgingival de pacientes saudáveis e com periodontite crônica, definindo padrões de colonização que foram divididos em complexos e relacionados com parâmetros clínicos de doença periodontal.

Esta associação entre as espécies subgingivais foi posteriormente representada por uma pirâmide, onde a base compreende os complexos que abrangem espécies colonizadoras da superfície do dente, que se proliferam nos estágios iniciais da doença periodontal. Na porção intermediária da pirâmide está o complexo laranja, considerado como a transição dos colonizadores iniciais e as espécies do complexo vermelho (topo da pirâmide), que se tornam mais dominantes nos estágios finais de desenvolvimento da placa (Figura 8) (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).



**Figura 8 – Diagrama de associação de espécies na placa subgingival (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).**



O complexo vermelho é formado pelas bactérias Gram-negativas *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* (até 2002 denominada *Bacteroides forsythus*) e *Treponema denticola*. O complexo laranja inclui as subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra* (anteriormente denominada *Peptostreptococcus micros*), *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae* e *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus* (SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

As três espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena* e *Capnocytophaga ochracea*), *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a formam o complexo verde; o complexo amarelo é formado por *Streptococcus* (como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*). *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula* formam o complexo roxo; espécies de *Actinomyces* formam o complexo azul (SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

A microbiota do complexo vermelho raramente é detectada na ausência da microbiota do complexo laranja, e quanto maiores os níveis detectados de bactérias do complexo laranja, maiores os níveis de colonização pelo complexo vermelho. Os complexos amarelo e verde apresentam uma preferência similar entre eles e uma fraca correlação com os complexos laranja e vermelho, enquanto o roxo não apresenta relações com os outros complexos (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Clinicamente, os complexos amarelo e verde estão associados com bolsas rasas (com profundidade < 3 mm), enquanto o laranja e o vermelho relacionam-se com lesões mais avançadas e com o aumento dos índices periodontais (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Posteriormente, os complexos da microbiota supragengival também foram analisados, apresentando similaridade com o encontrado na placa subgengival. A relação entre a composição microbiana das amostras de placa supragengival e os parâmetros clínicos avaliados demonstram a participação das espécies do complexo vermelho e laranja adjacentes aos sítios mais inflamados, além disso, existe uma forte correlação entre os níveis bacterianos na placa supragengival e profundidade de bolsa e nível clínico de inserção (HAFFAJEE *et al.*, 2008).

## 1.4 A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE AO DESAFIO BACTERIANO

O acúmulo do biofilme dental, colonização do sulco ou bolsa periodontal e invasão do epitélio gengival e tecidos conectivos na gengiva adjacente à superfície do dente estimulam a resposta do hospedeiro, envolvendo a ativação do sistema imune inato e adaptativo, com a produção de citocinas, quimiocinas e prostanoídes (NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007; GRAVES *et al.*, 2011a).

O termo “virulência” é definido como a habilidade de um organismo em causar doença ou interferir nas funções metabólicas ou fisiológicas de um hospedeiro. Desta forma, a virulência dos patógenos periodontais, como também a suscetibilidade do hospedeiro, são pré-requisitos necessários para o início e progressão da doença periodontal (HOLT & EBERSOLE, 2005).

### 1.4.1 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NA DOENÇA PERIODONTAL

A resposta do hospedeiro à proliferação bacteriana ocorre pela detecção dos micro-organismos e de seus fatores de virulência (como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), fímbrias ou o DNA bacteriano) através de vários tipos de receptores da imunidade inata. Dentre eles, o melhor grupo caracterizado é o dos receptores do tipo Toll (TLRs) (O’NEILL, 2002; AZUMA, 2006).

Uma vez que a gengiva é constantemente exposta aos micro-organismos do biofilme, a sinalização via TLRs têm um importante papel na resposta do sistema imune inato e na manutenção da saúde do periodonto. No entanto, a produção exacerbada de citocinas devido à estimulação crônica destes receptores leva à destruição tecidual, pois induz a liberação de proteinases que degradam o tecido e a ativação da via de reabsorção óssea (HANS & HANS, 2011).

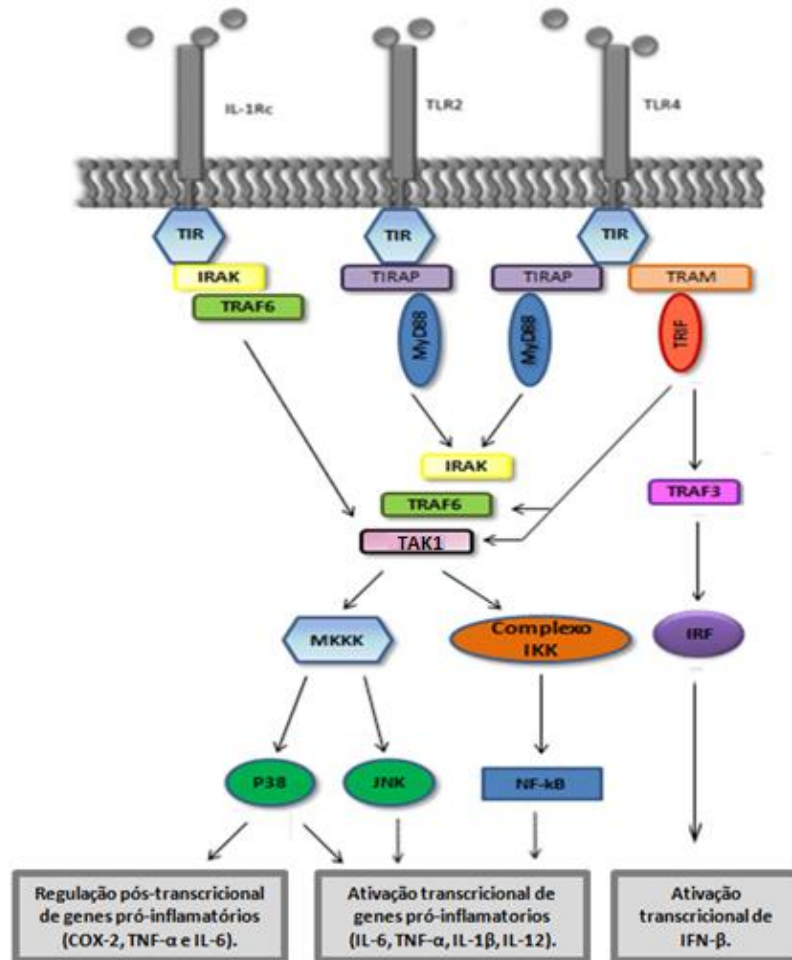
Os TLRs 2 e 4 são os principais envolvidos neste processo e estão presentes não apenas em células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas residentes, mas também em células epiteliais gengivais, fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007).

As espécies Gram-negativas associadas à periodontite *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *V. parvula* são todas capazes de ativar os TLRs 2. *A. actinomycetemcomitans* e *V. parvula* também podem ativar os TLRs 4 (KIKKERT *et al.*, 2007; KIRKWOOD & ROSSA JUNIOR, 2009).

A partir da interação com os TLRs, vias de sinalização dependentes e independentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) são iniciadas (Figura 9). Na via dependente, ocorre a interação dos domínios do receptor Toll-Interleucina 1 (TIR) e moléculas citoplasmáticas adaptadoras (TIRAP). O MyD88, uma molécula adaptadora chave, ativa receptores de interleucina (IL)-1 associados à quinase (IRAK) que, em associação ao receptor de fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF-6), leva à ativação da quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador beta (TAK1), que culmina com a fosforilação e degradação subsequente do inibidor do fator nuclear kappa B (IKK), liberando o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Simultaneamente, um grupo de proteínas quinases citoplasmáticas conservadas são sequencialmente ativadas, formando as classes de proteínas quinases ativadas por mitógeno p38 (MAPK p38) e quinase c-Jun N-terminal (JNK). A MAPK p38 e a JNK, assim como o NF- $\kappa$ B, são translocados ao núcleo, induzindo a expressão de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007; HANS & HANS, 2011; SOUZA *et al.*, 2012).

Na sinalização independente do MyD88, ocorre a interação entre TIR e moléculas adaptadoras (domínio TIR contendo adaptador do indutor de interferon beta, o TRIF, e molécula adaptadora relacionada ao TRIF, a TRAM), que se associam ao TRAF-3, ativando o fator regulador de interferon (IRF) e induzindo a expressão de interferon- $\beta$ , ou ao TRAF-6, interligando a via de sinalização independente com a dependente do MyD88 (AKIRA & TAKEDA, 2004; KIRKWOOD & ROSSA JUNIOR, 2009).

A ativação da MAPK/NF- $\kappa$ B também pode ser desencadeada pela família de receptores de IL-1 (IL-1Rc), levando à transcrição de mais citocinas pró-inflamatórias. As citocinas, por sua vez, podem atuar em outra via de sinalização que envolve as enzimas Janus quinases (JAK), associadas com a porção citoplasmática de receptores transmembranares. A ativação da JAK resulta na fosforilação de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), que se dimerizam e são translocados ao núcleo, também regulando a transcrição gênica de citocinas com atividades pro- e anti-inflamatórias (SOUZA *et al.*, 2012).



**Figura 9 – Ativação dos TLRs e IL-1Rc** (Adaptado de MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007; KIRKWOOD & ROSSA, 2009; HANS & HANS, 2011).

## 1.4.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E REABSORÇÃO ÓSSEA

### 1.4.2.1 CITOCINAS

As citocinas são definidas como proteínas regulatórias que controlam diferentes processos fisiológicos através da transmissão de sinais ou informações de uma célula a outra, no entanto, também induzem patologias quando expressas inapropriadamente. Em condições patológicas, como nas doenças periodontais, o balanço entre as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-11) e pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e -beta (TNF- $\beta$ ), IL-1, IL-6, IL-12, IL-17) está comprometido (GRAVES & COCHRAN, 2003; DEO & BHONGADE, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são encontradas abundantemente expressas no tecido gengival humano e concentrações elevadas das mesmas têm sido descritas no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com periodontite (REN *et al.*, 2009; FITZSIMMONS *et al.*, 2010; BUDUNELI & KINANE, 2011).

Modelos animais têm se mostrado importantes ferramentas para estudar as relações de causa e efeito entre citocinas e destruição tecidual (GRAVES, 2008; GRAVES *et al.*, 2011a). Utilizando o modelo de periodontite experimental em primatas, inibidores de TNF- $\alpha$  e IL-1 foram capazes de inibir o infiltrado inflamatório, a formação de osteoclastos, a reabsorção óssea e a progressão da doença (ASSUMA *et al.*, 1998; DELIMA *et al.*, 2001; DELIMA *et al.*, 2002). A administração do etanercept, um antagonista de TNF- $\alpha$ , em ratos submetidos ao modelo de periodontite experimental resultou na inibição da perda óssea e da migração de células inflamatórias (DI PAOLA *et al.*, 2007).

Garlet e colaboradores (2006) demonstraram a correlação entre o aumento da expressão de IL-1, TNF- $\alpha$  e MMPs em tecido gengival de camundongos submetidos à periodontite experimental pela inoculação na cavidade oral de uma suspensão de *A. actinomycetemcomitans*.

A IL-6 também apresenta um papel relevante na estimulação da atividade osteoclástica e no acometimento da doença. Baker e colaboradores (1999) demonstraram que, após administração oral de *P. gingivalis*, camundongos *knock-out* para IL-6 desenvolveram menor perda óssea se comparado a camundongos selvagens.

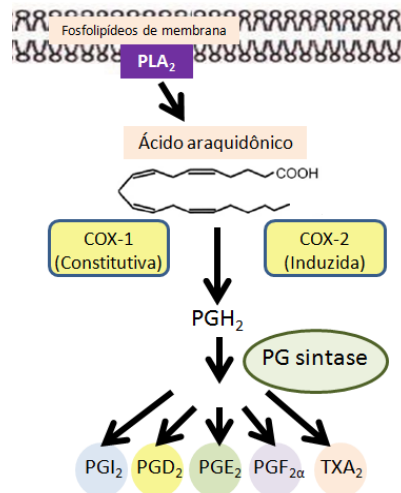
A IL-1 e o TNF são duas citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas à progressão da doença periodontal. A IL-1 induz o aumento da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, e estimula a produção de quimiocinas necessárias para o recrutamento dos leucócitos circulantes (como a IL-8), de outros mediadores que amplificam ou sustentam a reposta inflamatória (como prostaglandinas) e de enzimas como as MMPs (GRAVES & COCHRAN, 2003; DEO & BHONGADE, 2010).

A expressão de IL-17 é maior na periodontite crônica do que em tecidos sem evidência de doença periodontal e, em associação com a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , induz a produção de MMP por fibroblastos gengivais (BEKLEN *et al.*, 2007; OHYAMA *et al.*, 2009).

O TNF- $\alpha$  é um estimulador menos potente da produção de prostanoides em comparação a IL-1 $\beta$ , no entanto, estas duas citocinas agem sinergicamente aumentando a produção destes mediadores, especialmente a prostaglandina E<sub>2</sub>, que contribui para a reabsorção óssea (YUCCEL-LINDBERG *et al.*, 1999; NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007).

### 1.4.2.2 PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>

A liberação do ácido araquidônico, um ácido graxo de cadeia poli-insaturada, contendo 20 carbonos, da membrana plasmática por ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> e subsequente metabolização do mesmo pela enzima COX, leva a formação dos prostanoídes (PGs e a tromboxana A<sub>2</sub>) (Figura 10) (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).



**Figura 10 – Via de síntese dos prostanoídes.** Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) catalisa fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico em resposta a um estímulo inflamatório. O ácido araquidônico age como substrato das isoformas de ciclo-oxigenases, formando a prostaglandina H<sub>2</sub>, convertida em prostanoídes: Tromboxana A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e a prostaglandina F<sub>2α</sub> (Adaptado de NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007).

Existem duas importantes isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é uma isoforma constitutiva, responsável pela produção de PGs necessárias às funções fisiológicas, como a proteção da mucosa gástrica e manutenção da função plaquetária. A segunda isoforma, a COX-2, é predominantemente expressa durante reações inflamatórias, produzindo PGs que promovem o aumento do fluxo sanguíneo local, a permeabilidade vascular, migração celular e a percepção da dor, sendo constitutiva no sistema nervoso central, nos rins e no endotélio vascular (VANE *et al.*, 1998).

Os metabólitos do ácido araquidônico, particularmente a PGE<sub>2</sub>, parecem ser mediadores importantes na progressão da doença periodontal. Estudos demonstram que esse prostanoíde está em maiores concentrações no FCG e no tecido gengival de pacientes com periodontite, em comparação a pacientes saudáveis (GOODSON *et al.*, 1974; OFFENBACHER *et al.*, 1984; TSAI *et al.*, 1998; NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007).

A concentração de PGE<sub>2</sub> no FCG é maior em pacientes com periodontite agressiva em comparação aos pacientes com periodontite crônica, assim como em pacientes com periodontite crônica em comparação aos pacientes com gengivite, sugerindo que a dosagem de PGE<sub>2</sub> no FCG é capaz de indicar a gravidade da doença periodontal. Além disso, é um método não-invasivo, sensível e reprodutível (OFFENBACHER *et al.*, 1981; OFFENBACHER *et al.*, 1984).

Nakashima e colaboradores (1994) relacionaram o índice gengival e profundidade de bolsa maiores em sítios com periodontite, quando comparados aos sítios saudáveis ou com gengivite. Esta relação positiva entre a concentração de PGE<sub>2</sub> e acometimento do periodonto também foi demonstrada por Pouliot e colaboradores (2000) após análise do FCG de pacientes com periodontite agressiva localizada. Neste mesmo trabalho, a inoculação do periodontopatógeno *P. gingivalis* no modelo de *air pouch* estimulou a infiltração de leucócitos, aumento da expressão da COX-2 e dos níveis de PGE<sub>2</sub>.

Os níveis de PGE<sub>2</sub> também foram maiores em modelos *in vitro* de cultura de células do ligamento periodontal humano estimuladas com IL-1β, em comparação às células não estimuladas (MURAYAMA *et al.*, 2011). A cultura de fibroblastos gengivais humanos estimulados com biofilme subgengival também promove o aumento da produção de PGE<sub>2</sub>, em comparação aos não estimulados (BELIBASAKIS & GUGGENHEIM, 2011).

Estudos de imuno-histoquímica em tecidos gengivais saudável e inflamado de humanos demonstraram diferenças quanto à expressão das isoformas da COX. Em ambos, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais gengivais foram imunorreativas para a COX-1 e COX-2. No entanto, nas gengivas clinicamente saudáveis, a expressão de COX-2 foi detectada em baixos níveis. A expressão de COX-2 na gengiva inflamada também foi observada em macrófagos (CAVANAUGH *et al.*, 1995; MORTON & DONGARI-BAGSTZOGLOW, 2001; NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são inibidores das isoformas da COX, regulando assim a síntese dos metabólitos do ácido araquidônico, dentre eles, a PGE<sub>2</sub>. Em virtude das propriedades pró-inflamatórias deste prostanoide e por estar aumentado na doença periodontal, a modulação da sua síntese com o uso dos AINEs diminui a taxa de progressão da doença (GURGEL *et al.*, 2004). Diversos estudos demonstraram que o uso de AINEs, tanto em pacientes com periodontite

quanto em animais submetidos à doença está associado à melhora nos parâmetros clínicos (GRAVES *et al.*, 2012).

Nyman e colaboradores (1979) foram os pioneiros no estudo do emprego de AINEs em modelo de periodontite experimental em cães. Com a utilização da indometacina houve diminuição na progressão da doença periodontal, com redução da inflamação e perda óssea alveolar.

Waite e colaboradores (1981) observaram que pacientes que utilizavam AINEs a mais de um ano para o tratamento de doenças musculoesqueléticas inflamatórias apresentaram menor número de sítios com bolsas periodontais profundas e tinham índice gengival reduzido em comparação ao grupo que não fazia uso destes fármacos.

Estudos posteriores em modelos de periodontite em cães (WILLIAMS *et al.*, 1985; JEFFCOAT *et al.*, 1986; WILLIAMS *et al.*, 1988; HOWELL *et al.*, 1991; OFFENBACHER *et al.*, 1992), primatas (KORNMAN *et al.*, 1990; LI *et al.*, 1996), roedores (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2009) e em humanos (WILLIAMS *et al.*, 1989; HEASMAN *et al.*, 1993; JEFFCOAT *et al.*, 1995; REDDY *et al.*, 2003) com AINEs clássicos demonstraram diminuição na progressão da doença.

O uso de inibidores seletivos de COX-2 também foi efetivo na diminuição da perda óssea em modelos de periodontite experimental em ratos (BEZERRA *et al.*, 2000; LOHINAI *et al.*, 2001; HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; HOLZHAUSEN *et al.*, 2005; AZOUBEL *et al.*, 2007).

Yen e colaboradores (2008) observaram maiores ganhos de inserção clínica em pacientes com periodontite crônica que receberam celecoxibe por seis meses em conjunto com terapia mecânica periodontal, em comparação aos pacientes submetidos apenas à terapia mecânica.

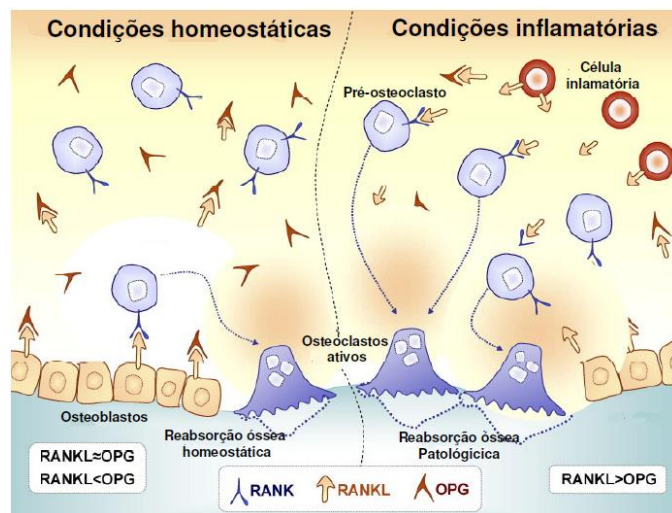
#### 1.4.2.3 EIXO RANK-RANKL-OPG

As citocinas pró-inflamatórias envolvidas durante a resposta inflamatória (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e outros mediadores estimulam os osteoblastos periosteos, fibroblastos gengivais, linfócitos TCD4+ e linfócitos B, alterando a expressão dos níveis do ligante do receptor ativador do NF-KB (RANKL), uma proteína constituída de 317 aminoácidos, pertencente à superfamília TNF e expressa na membrana e na forma solúvel (STEEVE *et al.*, 2004; GARLET *et al.*, 2006; COCHRAN, 2008).



Quando uma molécula de RANKL se liga ao receptor ativador do fator NF- $\kappa$ B (RANK), uma proteína transmembrana constituída por 616 aminoácidos pertencente à superfamília de receptores TNF, presente nos pré-osteoclastos, ocorre a diferenciação destes a osteoclastos maduros, capazes de digerir a matriz óssea (STEEVE *et al.*, 2004; TAUBMAN *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2008).

Em tecidos saudáveis existe um balanço entre as concentrações de RANKL e a osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel constituída por 380 aminoácidos; a OPG se liga ao RANKL, impedindo que este ative o RANK nos pré-osteoclastos, deste modo, a deposição e reabsorção óssea permanecem em equilíbrio. No entanto, o estímulo inflamatório aumenta a razão RANKL/OPG e, em consequência, a atividade osteoclástica (Figura 11) (STEEVE *et al.*, 2004; GRAVES *et al.*, 2011a).



**Figura 11 – Eixo RANK-RANKL-OPG.** Osteoclastogênese em condições homeostáticas e inflamatórias (Adaptado de MENEZES *et al.*, 2008).

A PGE<sub>2</sub> é um potente mediador da reabsorção óssea. Além de estimular a formação de osteoclastos indiretamente, ao promover a expressão de RANKL, exerce efeito direto sobre as células precursoras de osteoclastos e ainda inibe a expressão de OPG (SUDA *et al.*, 2004; THOMAS & PULEO, 2011; GRAVES *et al.*, 2011b; BUDUNELI & KINANE, 2011).

A IL-1 estimula a osteoclastogênese e a reabsorção óssea essencialmente através do estímulo à expressão de RANKL, enquanto o TNF- $\alpha$  parece interferir no metabolismo ósseo através de diversos mecanismos: direta e indiretamente sobre a formação de osteoclastos e reduzindo o número de osteoblastos (redução da proliferação, aumento da apoptose ou inibindo a diferenciação) (LIN *et al.*, 1994; TSUBOI *et al.*, 1999; WEI *et al.*, 2005).

O aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-13, apresentam correlação com a diminuição da expressão de RANKL e aumento da expressão de OPG (GARLET *et al.*, 2006; COCHRAN, 2008).

### 1.4.3 PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E ADAPTATIVO

#### 1.4.3.1 CÉLULAS RESIDENTES

As primeiras células a responderem aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) são as células epiteliais gengivais nas margens do sulco ou bolsa periodontal. A resposta da ativação dos TLRs nestas células inclui a liberação de calprotectinas,  $\beta$ -defensinas e indução da expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1, do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*) e IL-8, que recrutam neutrófilos não residentes (WEINBERG *et al.*, 1998; KUSUMOTO *et al.*, 2004; HANS & HANS, 2011).

Os TLRs ativados nas células epiteliais, bem como a ação dos micro-organismos e seus fatores de virulência que conseguiram transpor esta primeira barreira, medeiam a ativação dos TLRs em fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal e em células residentes (mastócitos, macrófagos e células dendríticas) (HANS & HANS, 2011).

Os mastócitos estão localizados próximo às superfícies epiteliais e vasos sanguíneos, ou seja, pontos estratégicos para a detecção de patógenos invasores. Dentre seus produtos, incluem-se mediadores pré-formados em grânulos (como a histamina, uma amina vasodilatadora), PGs, fatores de crescimento, como TGF- $\beta$  (do inglês, *Transforming Growth Factor- $\beta$* ), que estimula a produção de inibidores de MMPs (TIMPS, do inglês *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases*), e VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (IL-8) pró-inflamatórias (SUZUKI *et al.*, 2008).

Macrófagos residentes têm a expressão da COX-2 induzida pelas citocinas e pelo LPS bacteriano, estimulando a formação de prostanoídes, particularmente a PGE<sub>2</sub>, e mais citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , fatores de crescimento, MMPs e TIMPs. Estas células, assim como as células dendríticas, exercem o papel de células apresentadora de antígenos aos linfócitos, ligando a resposta inata à adaptativa (NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007).

### 1.4.3.2 CÉLULAS NÃO RESIDENTES

#### 1.4.3.2.1 NEUTRÓFILOS NAS DOENÇAS PERIODONTAIS

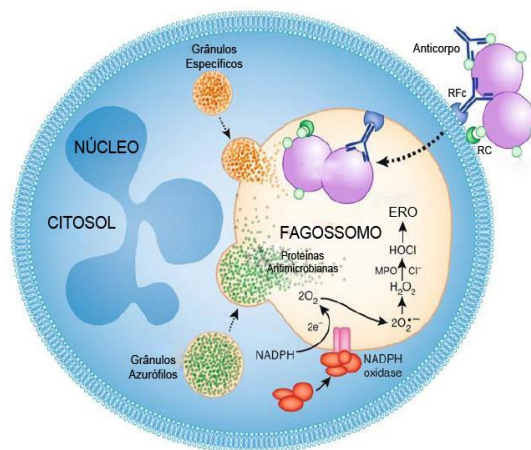
Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) formam a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, sendo considerados um tipo celular protetor chave nos tecidos periodontais e encontrados extensivamente na margem gengival e no epitélio. A histopatologia de lesões periodontais indicam que estas células formam uma “parede” entre o epitélio juncional e a placa dental patogênica (RYDER, 2010; SCOTT & KRAUSS, 2012; POLLANEN *et al.*, 2012).

O número de neutrófilos no FCG é rapidamente amplificado durante a conversão de um sulco saudável ( $7 \times 10^4$  neutrófilos/mL) para uma bolsa periodontal ( $20 \times 10^4$  neutrófilos/mL), constituindo cerca de 90% dos leucócitos ali presentes (UITTO *et al.*, 2003).

A função dos PMNs é reconhecer e fagocitar micro-organismos extracelulares, seguido pela atividade bactericida. Este reconhecimento ocorre através de moléculas do hospedeiro ligadas à superfície das bactérias (opsoninas, IgG, C3b), seguido pelo englobamento através de invaginações na membrana plasmática, formando um fagossomo (NUSSBAUM & SHAPIRA, 2011).

Os fagossomos se fundem com vesículas presentes no citoplasma dos neutrófilos, onde estão armazenadas moléculas utilizadas na defesa do hospedeiro (mieloperoxidase, elastase, catepsina B e D, lactoferrina, MMP, dentre outras). O conteúdo dos grânulos é liberado e tem-se a morte intracelular da bactéria. A destruição dos patógenos ocorre por vias dependentes e/ou independentes de oxigênio (pelo estresse oxidativo e através das enzimas proteolíticas no interior dos grânulos, respectivamente) (UITTO *et al.*, 2003; KENNEDY & DELEO, 2009).

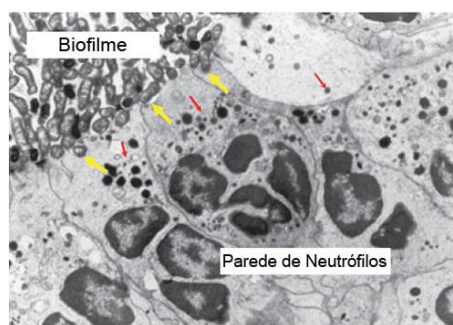
A NADPH oxidase citosólica é translocada para a membrana do fagossomo mediante estímulos pró-inflamatórios, formando-se um complexo da NADPH oxidase com o citocromo b558 (fagossomal), originando ânions superóxidos. Proteínas presentes nos grânulos também contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio com os fagossomos, mais notadamente a mieloperoxidase: produz  $\text{OH}^\cdot$  e oxigênio singlete, bem como ácido hipocloroso (a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido clorídrico. Esta forte combinação (estresse oxidativo e mieloperoxidase) é suficiente para matar muitos procariontes, comprometendo bicamadas de fosfolípidos, induzindo danos ao DNA e fragmentando/inativando proteínas (Figura 12) (SCOTT & KRAUSS, 2012).



**Figura 12 – Fagocitose e atividade microbicida dos neutrófilos.** Após fagocitose, micro-organismos são destruídos por espécies reativas de oxigênio (ERO) e por proteínas antimicrobianas liberadas dos grânulos. RFc: receptores de Fc; RC: Receptores do complemento (Adaptado de KENNEDY & DELEO, 2009).

Os neutrófilos ainda exibem uma maneira adicional no combate aos micro-organismos com as chamadas “armadilhas extracelulares neutrofílicas” (NETs, do inglês *neutrophils extracellular traps*). Eles liberam fibras de cromatina combinadas com grânulos proteicos que se ligam e matam bactérias e outros patógenos, bem como degradam fatores de virulência por vias proteolíticas (BRINKMANN *et al.*, 2010; YIPP *et al.*, 2012).

A natureza da resposta neutrofílica ao biofilme oral pode promover um desequilíbrio homeostático: enzimas lisossomais proteolíticas dos grânulos dos neutrófilos, produtos do estresse oxidativo e outras substâncias pró-inflamatórias podem ser liberadas diretamente na bolsa periodontal e nos tecidos adjacentes. Essa atividade exacerbada dos neutrófilos pode causar dano tecidual e prolongar a extensão e gravidade do processo inflamatório nas doenças periodontais (Figura 13) (RYDER, 2010; SCOTT & KRAUSS, 2012).



**Figura 13 – Neutrófilos na bolsa periodontal formando uma parede contra o biofilme.** Os neutrófilos não conseguem englobar todo o biofilme (seta amarela), a formação desta parede consiste em um mecanismo protetor, no entanto, a fagocitose “frustrada” leva a liberação de enzimas dos grânulos (setas vermelhas) e outros produtos que terão efeito destrutivo (Adaptado de RYDER, 2010).

O processo destrutivo evidente na periodontite agressiva pode estar associado a polimorfismos genéticos que resultem em neutropenia ou prejudiquem a função neutrofílica (como deficiência de adesão leucocitária, Síndrome de *Chediak-Higashi* e a Síndrome de *Papillon-Lefèvre*) (SHIBATA *et al.*, 2000; GRONERT *et al.*, 2004).

No entanto, em contraste à função prejudicada, alguns estudos têm indicado que os neutrófilos estão hiperreativos em diferentes formas de periodontite, levando à liberação de grandes quantidades de enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio em comparação aos PMNs de indivíduos saudáveis, o que pode contribuir, em parte, para a destruição dos tecidos do periodonto (MATTHEWS *et al.*, 2007; NIBALI *et al.*, 2010; ABOODI *et al.*, 2011).

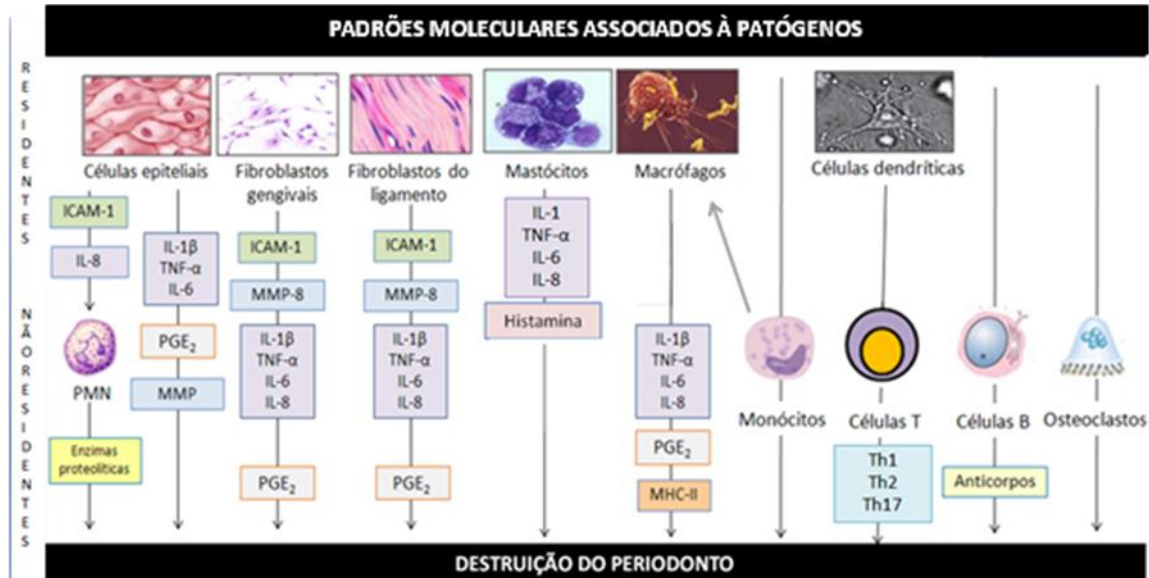
#### 1.4.3.2.2 LINFÓCITOS NAS DOENÇAS PERIODONTAIS

As células chave da resposta imune adaptativa são os linfócitos T (*T-helper-1* (*Th1*), *T-helper-2* (*Th2*) e células *natural killer*) e linfócitos B. Eles apresentam receptores de membrana que reconhecem os antígenos bacterianos acoplados às células apresentadoras de antígenos. O reconhecimento dos antígenos junto à coestimulação pelo TNF leva à ativação de linfócitos, produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Linfócitos *Th1* expressam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ; a resposta *Th2* leva à produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 (GARLET *et al.*, 2006; GRAVES, 2008; POLLANEN *et al.*, 2012).

Outras subpopulações de linfócitos T descritas também participam ativamente deste processo, como as células T reguladoras (Treg), produzindo IL-10, e as *Th17*, produzindo IL-17 (HARRINGTON *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2009; GRAVES *et al.*, 2011a).

Os linfócitos B produzem anticorpos, principalmente da classe IgG, atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T e secretam TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  (BERGLUNDH & DONATI, 2005; DUMITRESCU & TANAKA, 2010).

Paradoxalmente, a resposta inflamatória que deve ser protetora ao combater o patógeno, quando exacerbada, compromete a integridade do periodonto (Figura 14) (NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007; DUMITRESCU & TANAKA, 2010; HANS & HANS, 2011; GRAVES *et al.*, 2011a).



**Figura 14 – Participação das células residentes e não residentes em resposta à ativação de receptores do tipo Toll** (Adaptado de NOGUCHI & ISHIKAWA, 2007; DUMITRESCO & TANAKA, 2010; HANS & HANS, 2011).

### 1.5 TERAPIAS NÃO-CIRÚRGICAS NO MANEJO DA PERIODONTITE

O principal manejo da periodontite é através de raspagem e alisamento radicular, um método mecânico de retirada da placa bacteriana supra e subgengival. Somado à higiene oral adequada, é possível ter melhora na perda de inserção dentária em pacientes com periodontite (DRISKO, 2001; DEO & BHONGADE, 2010).

O enxaguatório bucal contendo gluconato de clorexidina a 0,12% (PerioGard<sup>®</sup>) é um antisséptico do grupo das bisguanidas catiônicas, possui amplo espectro de ação, inibindo a formação de placa e o desenvolvimento da gengivite crônica. Pode ser empregado durante a terapia periodontal inicial ou para a manutenção periodontal (KRAYER *et al.*, 2010).

Devido à natureza e complexidade do biofilme subgengival, em alguns casos faz-se necessário regimes de tratamentos adjuvantes à terapia mecânica. Antimicrobianos de administração sistêmica como amoxicilina, metronidazol, ciprofloxacino, azitromicina, tetraciclina e clindamicina podem ser utilizados (KRAYER *et al.*, 2010).

Existem sistemas de liberação local contendo antimicrobianos, como o gel de metronidazol (Elysol<sup>®</sup>), chip de clorexidina (PerioChip<sup>®</sup>), fibras de tetraciclina (Actisite<sup>®</sup>), esferas de minociclina (Arestin<sup>®</sup>) e gel de doxiciclina (Atridox<sup>®</sup>). No entanto, além de algumas limitações apresentadas por estes dispositivos, eles não

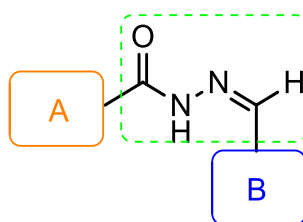
estão disponíveis no mercado nacional, o que inviabiliza sua utilização, principalmente pelo alto custo (MEIRA *et al.*, 2007).

Três tipos de agentes moduladores da resposta do hospedeiro têm sido investigados para o controle da progressão da periodontite: agentes anti-proteinases (como o Periostat<sup>®</sup>, um medicamento aprovado pelo FDA que contém como princípio ativo a doxiciclina em subdoses para a atividade antimicrobiana, inibindo MMPs), agentes antirreabsortivos (já que atuam no metabolismo ósseo, como os bifosfonatos) e agentes que interferem na resposta imunoinflamatória (AINEs e mediadores lipídicos endógenos que promovem a resolução da inflamação) (REDDY *et al.*, 2003; LANE *et al.*, 2005; GIANOBILO, 2008; CATON & RYAN, 2011; VAN DYKE, 2011).

## 2 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) se situa no âmbito da Química Medicinal e objetiva o planejamento racional, o desenho estrutural, a síntese e avaliação farmacológica de novos compostos candidatos a protótipos de novos fármacos.

O LASSBio caracterizou a função *N*-acilidrazona (Figura 15) como um grupamento farmacofórico, ou seja, como a subunidade estrutural essencial às atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antiagregante plaquetária observadas em compostos bioativos (BARREIRO *et al.*, 2002; FRAGA & BARREIRO, 2006; DUARTE *et al.*, 2007).



**Figura 15 – Estrutura dos derivados *N*-acilidrazônicos.** A marcação pontilhada verde indica a função *N*-acilidrazona, sendo A e B substituintes quaisquer.

O derivado LASSBio-930 (Figura 16A) destaca-se por seu perfil anti-inflamatório em modelos de inflamação aguda, como no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) e no edema de orelha de camundongos induzido por ácido araquidônico (300  $\mu\text{mol/kg}$ ), nos quais a inibição do edema foi de 59,6% e 65,3%, respectivamente, e no modelo de inflamação crônica de artrite induzida por adjuvante de Freud em ratos (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), reduzindo o edema e o diâmetro articular em 33% e 20%, respectivamente. Além disso, em concentrações acima de 5  $\mu\text{M}$  apresentou inibição total da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (TRIBUTINO, 2008; TRIBUTINO *et al.*, 2009).

Este perfil ocorre aparentemente pela inibição não seletiva da COX, embora preferencial de COX-1 ( $\text{CI}_{50} = 4,1 \mu\text{M}$ , *versus* 10,2  $\mu\text{M}$  para COX-2, no modelo de sangue humano total). LASSBio-930 não apresentou gastroirritação até a dose de 600  $\mu\text{mol/kg}$  (TRIBUTINO, 2008; TRIBUTINO *et al.*, 2009).

Assim como o derivado LASSBio-930, o composto LASSBio-651 (Figura 16B) (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) também apresentou perfil anti-inflamatório no modelo de inflamação aguda de edema em pata de rato (redução de 57,5% do edema provocado) e



reduziu a migração celular e volume do exsudato no modelo de pleurisia em ratos, ambos induzidos pela carragenina. No modelo crônico de artrite em ratos induzida por adjuvante de Freund reduziu o edema em 47%. No exsudado inflamatório provocado por carragenina no modelo de *air pouch* em ratos, a produção de PGE<sub>2</sub> foi reduzida em 65,9%. A 100 µM inibiu em 99,5% a produção de TXB<sub>2</sub> em plaquetas de coelho estimuladas com colágeno; a 10 µM inibiu a produção de TNF-α *in vitro* por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados por LPS.

Estes resultados permitiram sugerir que o derivado LASSBio-651 exerce ação dual, inibindo as isoformas da COX e a produção de TNF-α. LASSBio-651 não mostrou ser gastroirritante até a dose de 1200 µmol/kg (resultados não-publicados).

Tendo em vista que a resposta imunoinflamatória do hospedeiro está intimamente relacionada com o início e progressão da periodontite, e que diversos trabalhos na literatura demonstraram melhora nas condições periodontais pela modulação dessa resposta, resolvemos investigar o perfil de atividade desses derivados previamente caracterizados por seu perfil anti-inflamatório sobre a doença periodontal.

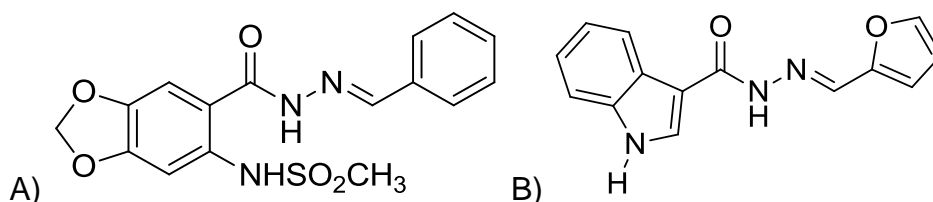


Figura 16 – Estrutura dos derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 (A) e LASSBio-651 (B).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos LASSBio-930 e LASSBio-651 no modelo de periodontite experimental em ratos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar no modelo de periodontite experimental em ratos a atividade dos derivados *N*-acilidrazônicos sobre:

- A perda óssea alveolar, através de análises macroscópicas;
- Os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival;
- Alterações morfológicas dos tecidos do periodonto, através de análises histológicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Ácido bicinconínico	SIGMA
Ácido nítrico	REAGEN
Albumina	SIGMA
Azul de metileno	REAGEN
Cetamina/Xilazina	KÖNIG
Cloreto de Potássio (KCl)	REAGEN
Cloreto de sódio (NaCl)	CALEDON
Dimetilsulfóxido (DMSO)	SIGMA
Ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA)	SIGMA
Fosfato de Potássio Monobásico	REAGEN
Fosfato de Potássio Bibásico	GRUPO QUÍMICA
Fosfato de Sódio Monobásico	MERCK
Fosfato de Sódio Bibásico	GRUPO QUÍMICA
Formaldeído	REAGEN
Hexadeciltrimetil amônio (HTAB)	SIGMA
Indometacina	SIGMA
Peróxido de hidrogênio	VETEC
Sulfato de Cobre II	SIGMA
Tetrametilbenzidina (TMB)	BD BIOSCIENCE
Tween 80	ISOFAR

## 4.2 KIT DE DOSAGENS

Kit de dosagem de PGE<sub>2</sub>

CAYMAN

## 4.3 SOLUÇÕES

**Azul de metileno 1%**

Eosina	1 g
Água destilada	q.s.p. 100 ml

**Solução HTAB 0,5%**

## 1ª etapa

A-	Fosfato de potássio monobásico monoidratado	0,00671 g
	Água destilada	q.s.p. 100 ml
B-	Fosfato de potássio bibásico diidratado	0,1044 g
	Água destilada	q.s.p. 100 ml

## 2ª etapa

Solução A	98,8 ml
Solução B	1,2 ml
HTAB	500 mg

**Solução tampão fosfato-salina (PBS)**

Fosfato de sódio monobásico monoidratado	0,83 g
Fosfato de sódio bibásico diidratado	1,8 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g

Água mili-Q	q.s.p. 1,0 L
-------------	--------------

O pH da solução deve ser ajustado para 7,4.

**Solução tampão fosfato 0,1M** (contendo 1mM EDTA e 10 $\mu$ M indometacina)

1ª etapa

A-	Fosfato de sódio monobásico monoidratado	0,69 g
	Água destilada	q.s.p. 25 mL
B-	Fosfato de sódio bibásico dodecaidratado	7,17 g
	Água destilada	q.s.p. 100 mL

2ª etapa

Solução A	19 mL
Solução B	81 mL
EDTA	0,0584 g
Indometacina	0,0007 g
Água destilada	q.s.p 200 mL

O pH da solução deve ser ajustado para 7,4.

**Formaldeído tamponado 10%**

Fosfato de sódio dibásico anidro	6,5 g
Fosfato de sódio monobásico diidratado	4,0 g
Formaldeído	100 mL
Água destilada	q.s.p. 1,0 L

## 4.4 METODOLOGIAS EMPREGADAS

### 4.4.1 ANIMAIS E ÉTICA

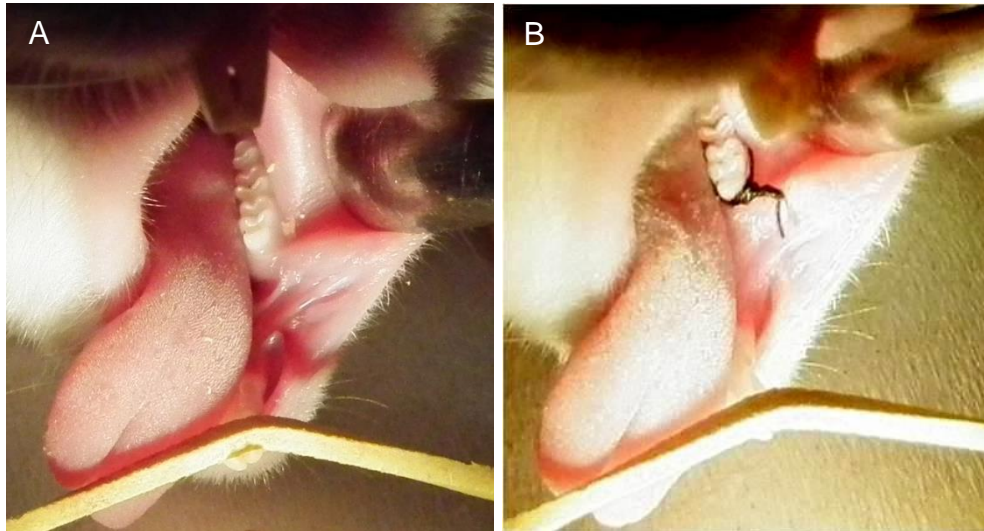
Ratos wistar utilizados no presente trabalho foram mantidos no biotério do LASSBio, localizado no Centro de Ciências e Saúde (CCS) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com livre acesso à água e ração, em condições de temperatura ambiente variando de 25-28°C, com ciclo de claro e escuro de 12 horas.

Todos os experimentos obedeceram os princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais de experimentação do CCS da UFRJ (CEUA-UFRJ). O protocolo de indução de periodontite experimental em ratos foi aprovado pelo CEUA-UFRJ sob o número DFBCICB044.

### 4.4.2 PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

As vantagens da utilização de roedores nos estudos da doença periodontal são o tamanho dos animais, o custo, a fácil manipulação (JORDAN, 1971) e a facilidade de reprodutibilidade da doença (FRENKEL, 1969). Além disso, a estrutura da área dentogengival no rato, incluindo o epitélio juncional e sua inserção na superfície dental, bem como a configuração e topografia dos tecidos epiteliais na margem gengival, o sulco gengival raso e a superfície livre do epitélio juncional, são bem similares aos encontrados em humanos (PAGE, 1982; STRUILLLOU *et al.*, 2010).

O protocolo utilizado para indução de periodontite em ratos foi descrito por Sallay e colaboradores (1982). A metodologia consiste na indução da doença através da colocação de um fio de seda ao redor da cérvice do molar, em posição mesial (Figura 17). A permanência da ligadura promove a retenção de alimentos, favorecendo a proliferação bacteriana, que desencadeia a resposta inflamatória local e resulta na destruição dos tecidos de suporte do dente.



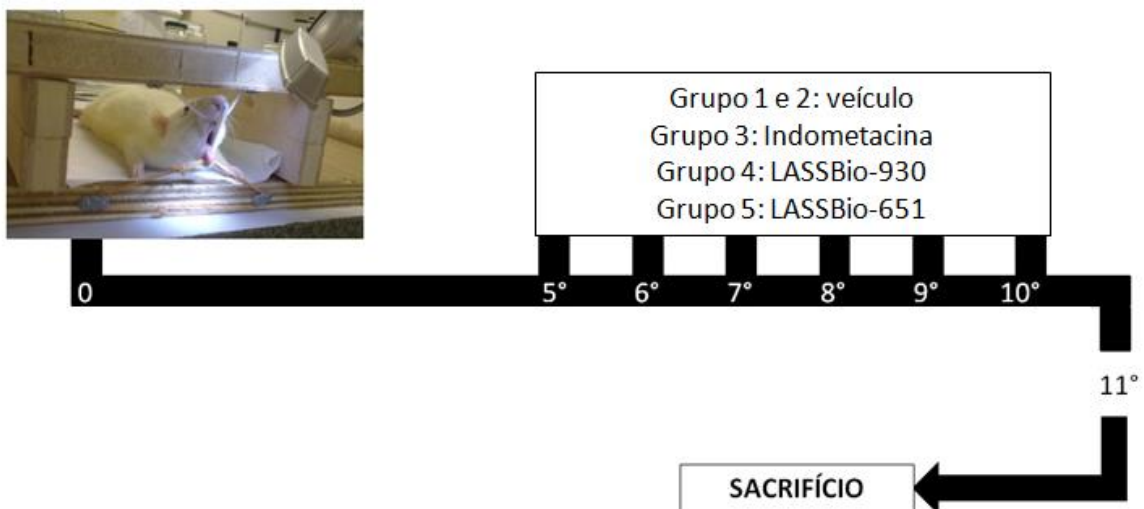
**Figura 17 – Periodontite experimental em ratos induzida por ligadura.** A) Rato wistar sem a ligadura; B) Rato wistar com a ligadura ao redor do 1° molar mandibular.

O modelo da ligadura é capaz de mimetizar o que é observado na periodontite humana já que envolve a participação da microbiota naturalmente presente, em contraste a modelos de monoinfecção com micro-organismos geralmente presentes em humanos, com a participação de fatores de virulência resultando na resposta do hospedeiro e afetando o perfil de citocinas e mediadores inflamatórios no tecido gengival (SOUZA *et al.*, 2011).

Para o presente trabalho, padronizou-se o uso do fio de seda estéril, de espessura 3.0 e colocação desta ligadura ao redor da cervice do primeiro molar mandibular, em ambos os lados (dia 0). De acordo com Queiroz-Junior e colaboradores (2009), no quinto dia após a colocação da ligadura, a doença está estabelecida, tendo seu pico no décimo dia. Portanto, administrou-se a substância teste ou o veículo do 5° ao 10° dia após a indução da doença (Figura 18).

Ratos wistar machos (200-250 gramas) foram anestesiados com cetamina/xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos (6-13 por grupo): em um dos grupos (grupo sham), o fio foi colocado e retirado (dia 0) em seguida, desta forma, descartou-se a possibilidade da lesão pela colocação da ligadura contribuir para a progressão da periodontite induzida. Os demais grupos (grupo controle e grupos tratados) tiveram os molares amarrados e a ligadura permaneceu intacta durante todo o período experimental.

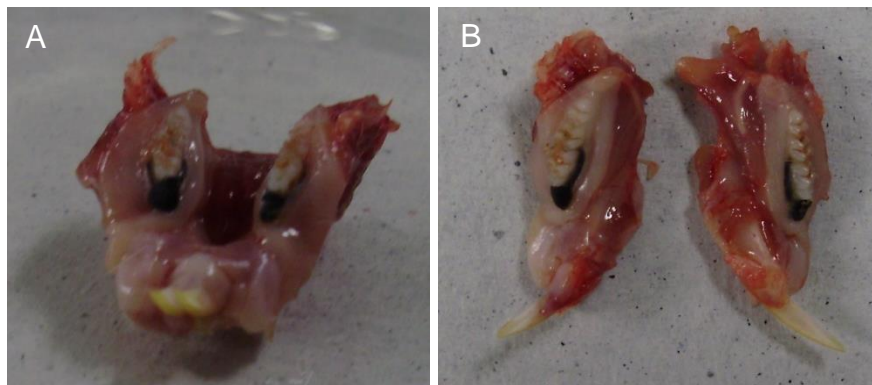
- a) grupo 1 (grupo sham, sem a doença) – administrou-se o veículo das substâncias a serem testadas (PBS+Tween 80 1%+DMSO 2%) por via oral (1x ao dia, 5° ao 10° dia);
- b) grupo 2 (grupo controle, com a doença) – administrou-se o veículo das substâncias a serem testadas (PBS+Tween 80 1%+DMSO 2%) por via oral (1x ao dia, 5° ao 10° dia);
- c) grupo 3 (grupo tratado, com a doença) – os animais foram tratados com a indometacina na dose de 14  $\mu\text{mol/kg/dia}$  veiculada em PBS+Tween 80 1%+DMSO 2% por via oral (1x ao dia, 5° ao 10° dia).
- d) grupo 4 (grupo tratado, com a doença) – os animais foram tratados com o composto *N*-acilidrazônico LASSBio-930 na dose de 100  $\mu\text{mol/kg/dia}$  veiculado em PBS+Tween 80 1%+DMSO 2% por via oral (1x ao dia, 5° ao 10° dia).
- e) grupo 5 (grupo tratado, com a doença) – os animais foram tratados com o composto *N*-acilidrazônico LASSBio-651 na dose de 100  $\mu\text{mol/kg/dia}$  veiculado em PBS+Tween 80 1%+DMSO 2% por via oral (1x ao dia, 5° ao 10° dia).



**Figura 18 – Desenho experimental:** indução da periodontite pela colocação da ligadura no dia 0, tratamento do 5° ao 10° dia e sacrifício no 11° dia.



No 11º dia após a indução da doença, os animais foram sacrificados em atmosfera saturada de CO<sub>2</sub> e a mandíbula foi retirada e seccionada em duas partes (Figura 19): a hemi-mandíbula esquerda foi processada para montagem de lâminas e análise histológica. A partir da hemi-mandíbula direita, o tecido gengival ao redor dos molares foi removido para análises bioquímicas e, em seguida, esta hemi-mandíbula foi analisada macroscopicamente para avaliação de perda óssea.



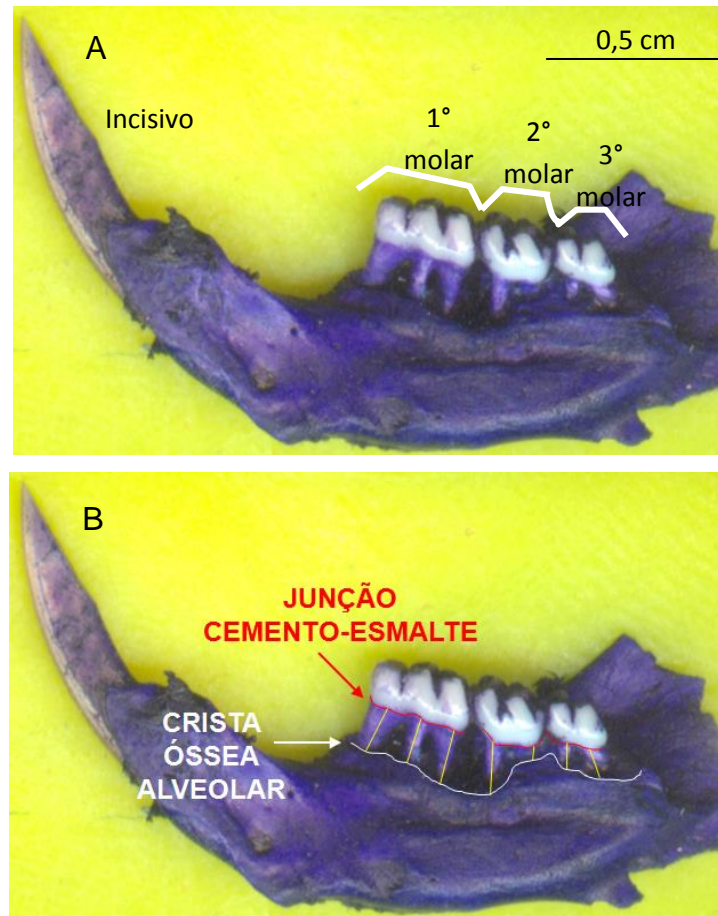
**Figura 19 – Mandíbula de rato sacrificado após 11 dias da colocação da ligadura.** A) Mandíbula inteira; B) Mandíbula seccionada: hemi-mandíbula direita e esquerda do animal, respectivamente.

Os estômagos foram retirados, abertos na curvatura maior e analisados macroscopicamente quanto à presença de pontos hemorrágicos; outros órgãos (fígado e baço) foram armazenados em formaldeído tamponado a 10% para posterior análise histológica.

#### 4.4.3 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR: MÉTODO MACROSCÓPICO

Após a retirada do tecido gengival, a hemi-mandíbula direita foi imersa em peróxido de hidrogênio por 7 horas, os tecidos moles foram removidos e procedeu-se a coloração da mesma com solução de azul de metileno 1% por 25 minutos. O azul de metileno cora o osso e o cimento, delimitando a junção cimento-esmalte, o que facilita a visualização e mensuração da raiz exposta.

As hemi-mandíbulas foram escaneadas (HP Scanjet 3500c Series 2.0) com resolução de 1200x4800 dpi (do inglês, *dots per inch*) e a perda óssea alveolar foi expressa pelo somatório, em milímetros, das distâncias entre a crista do osso alveolar e a junção cimento-esmalte de todas as raízes dos três molares (face lingual), com o auxílio do software de processamento de imagem Image pro-plus 6.0 por um examinador cego (Figura 20) (CRAWFORD *et al.*, 1978).



**Figura 20 – Análise de perda óssea pelo método macroscópico.** A) Hemi-mandíbula direita escaneada após retirada dos tecidos moles e coloração com azul de metileno; B) Delimitação da JCE em vermelho e da crista óssea alveolar, em branco. As linhas amarelas demonstram o modo como a medida de cada raiz é feita.

#### 4.4.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS A PARTIR DO TECIDO GENGIVAL

O tecido gengival coletado da hemi-mandíbula direita dos ratos foi armazenado em tampão fosfato 0,1M, contendo indometacina e EDTA, a  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $5\mu\text{L}$  do tampão/mg de tecido coletado), até o momento da dosagem. As dosagens seguiram um fluxograma padronizado (Figura 21).

##### 4.4.4.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A dosagem de proteínas totais (SMITH *et al.*, 1985) foi realizada afim de relacionar a concentração de  $\text{PGE}_2$  e a atividade de MPO obtidas com a quantidade de proteínas presente na amostra.

A um volume de  $25\mu\text{L}$  dos homogenatos de tecido gengival obtidos (tanto em tampão fosfato, quanto em HTAB) foram adicionados  $200\mu\text{L}$  da solução de sulfato de cobre II em ácido bicinconínico (proporção 1:50). Após 20 minutos na estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ ), procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 540 nanômetros e os

resultados obtidos foram interpolados com os valores de densidade ótica (D.O.) da curva padrão de albumina.

#### 4.4.4.2 DOSAGEM DE PGE<sub>2</sub> DO TECIDO GENGIVAL

A amostra foi triturada/homogeneizada com o uso do Turrax<sup>®</sup> (13000 RPM por 2,5 minutos) em um volume total de 500 µL de tampão fosfato 0,1M, contendo indometacina e EDTA, seguido de centrifugação a 4500 RPM (15 minutos). As análises da produção de PGE<sub>2</sub> em tecido gengival foram realizadas através de ensaios imunoenzimáticos, utilizando kit comercial específico. Os resultados foram expressos em pg/mg de proteínas.

#### 4.4.4.3 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE DO TECIDO GENGIVAL

A dosagem da atividade de MPO foi realizada como uma medida indireta para determinar a migração de neutrófilos para o tecido gengival inflamado após indução da periodontite. A metodologia empregada foi descrita por Andrews e Krinsky (1982). Neste ensaio, adicionou-se ao tecido gengival 500 µL de solução de HTAB 0,5%. Após a homogeneização/trituração com auxílio do Turrax<sup>®</sup> (13000 RPM por 2:30 minutos) e centrifugação a 4500 RPM (15 minutos), adicionou-se 25 µL das amostras, 25 µL da solução de tetrametilbenzidina (TMB) e após 10 minutos no agitador, 25 µL do reagente de parada da reação, procedendo-se a leitura a 630 nanômetros no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em D.O./mg de proteínas.

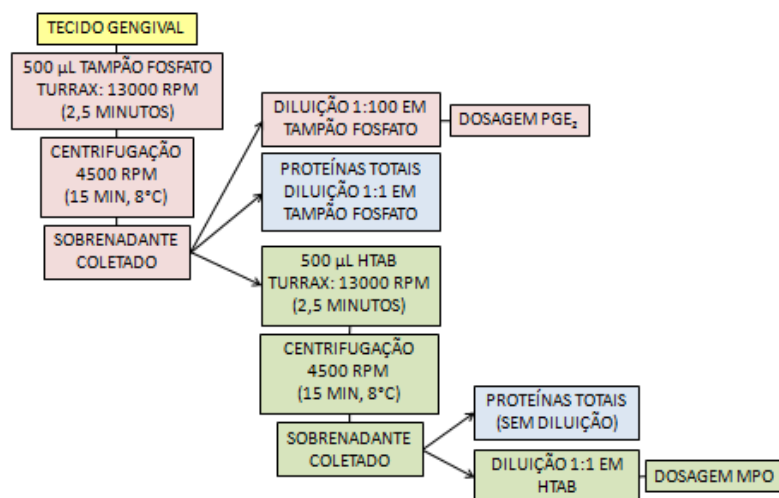
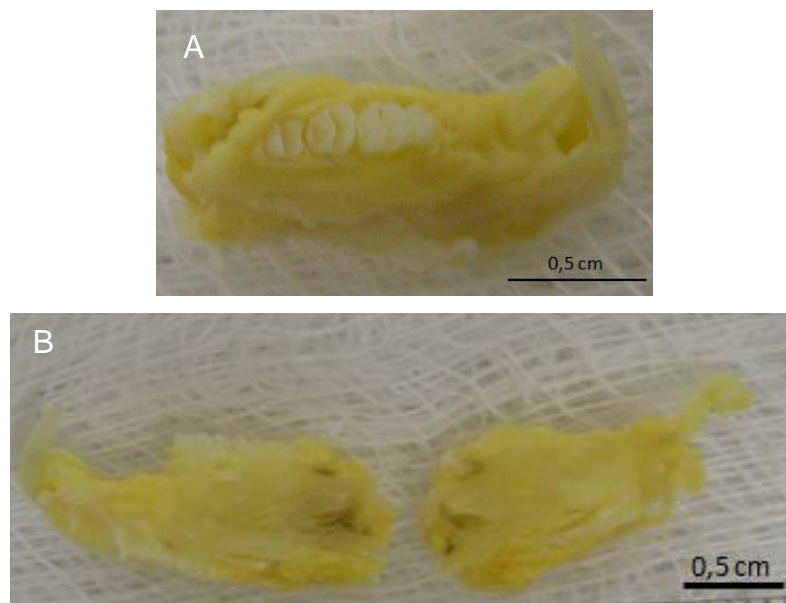


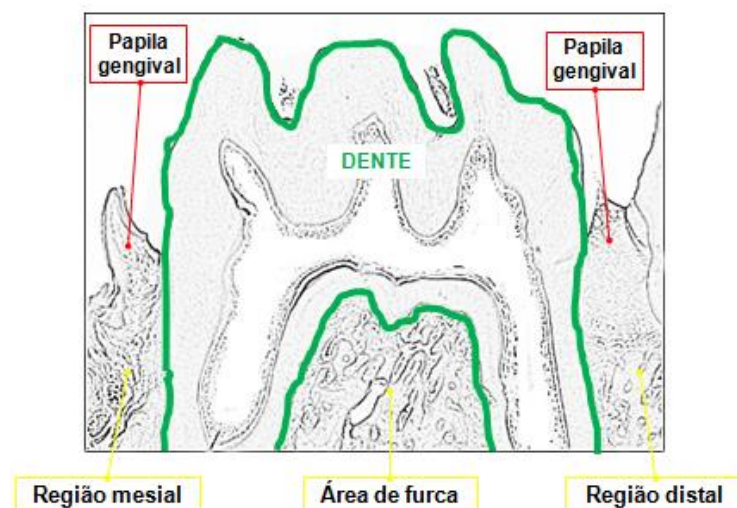
Figura 21 – Fluxograma de dosagens padronizado.

#### 4.4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

A hemi-mandíbula esquerda foi desmineralizada (ácido nítrico 5%, durante 6 dias, troca diária), cortada em direção sagital e processada através de desidratação em soluções crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina (Figura 22). Com o micrótomo, foram feitos cortes (6  $\mu$ m) a partir dos blocos e as lâminas foram montadas e coradas com hematoxilina e eosina, procedendo-se a análise descritiva da região mesial, de furca e distal dos primeiros molares (Figura 23).



**Figura 22 – Obtenção do material para análise histopatológica.** A) Hemi-mandíbula esquerda após descalcificação; B) Corte sagital na hemi-mandíbula esquerda para ser processada.



**Figura 23 – Representação das regiões mesial, de furca e distal do primeiro molar mandibular.**

#### 4.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (one-way-ANOVA seguido do pós teste Bonferroni, para análise de perda óssea; two-way-ANOVA, para análise da variação de peso dos animais) ou teste Mann Whitney (para análise das dosagens bioquímicas). Todos os testes foram feitos para um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ou em mediana (*box plot*, mínimo ao máximo), utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

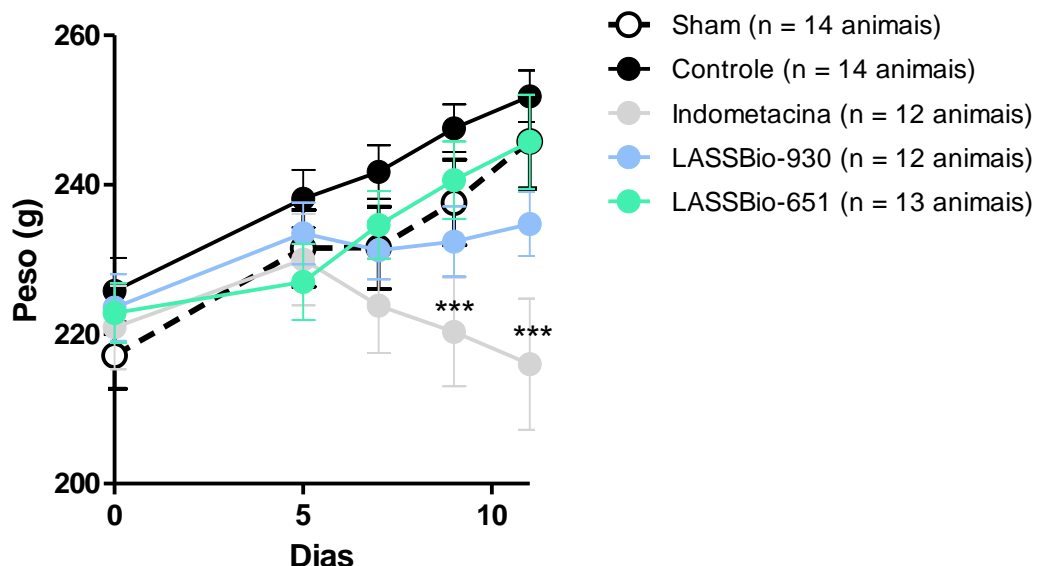
## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: ESTUDO DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-930 E LASSBio-651

#### 5.1.1 AVALIAÇÃO DO PESO E ASPECTOS GERAIS DOS ANIMAIS

Durante o período experimental (11 dias), os animais dos grupos sham, controle e tratados com os compostos LASSBio-930 e LASSBio-651 não apresentaram alterações clínicas visíveis. O comportamento dos animais e o aspecto da pelagem mantiveram-se normais e não foram encontradas lesões na pele e mucosas. Os ratos foram pesados em dias alternados a partir da indução da doença e apresentaram ganho de peso dentro dos padrões de normalidade.

No decorrer do tratamento do grupo de animais com indometacina, observaram-se alterações nos pelos (piloereção), fechamento parcial dos olhos, mucosa nasal com vestígios de sangue e comportamento atípico dos animais. A mortalidade de animais neste grupo foi de 33% e os animais sobreviventes não ganharam peso, em comparação ao grupo controle, sendo estatisticamente menores a partir do 9º dia (Gráfico 1).



**Gráfico 1 – Peso dos animais nos dias 0, 5, 7, 9 e 11.** Administração v.o. do veículo (PBS+tween 80 1% e DMSO 2%), indometacina (14  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou das substâncias teste (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), uma vez ao dia, do 5º ao 10º dia após indução da doença. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Two-away-ANOVA, Bonferroni).

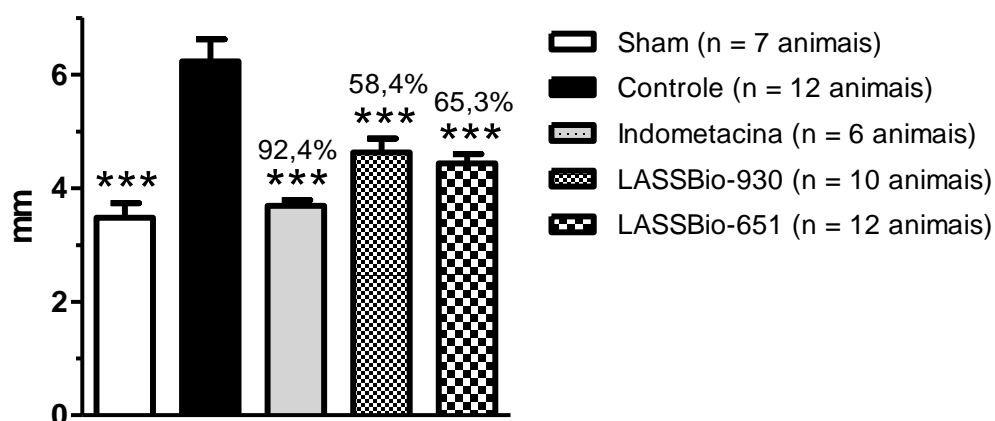
### 5.1.2 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

A análise de perda óssea alveolar foi realizada através do método macroscópico, permitindo uma análise robusta, já que reúne as distâncias entre a crista do osso alveolar e a junção cimento-esmalte de todas as sete raízes, dos três molares inferiores da hemi-mandíbula direita (face lingual) (Gráfico 2; Figura 24).

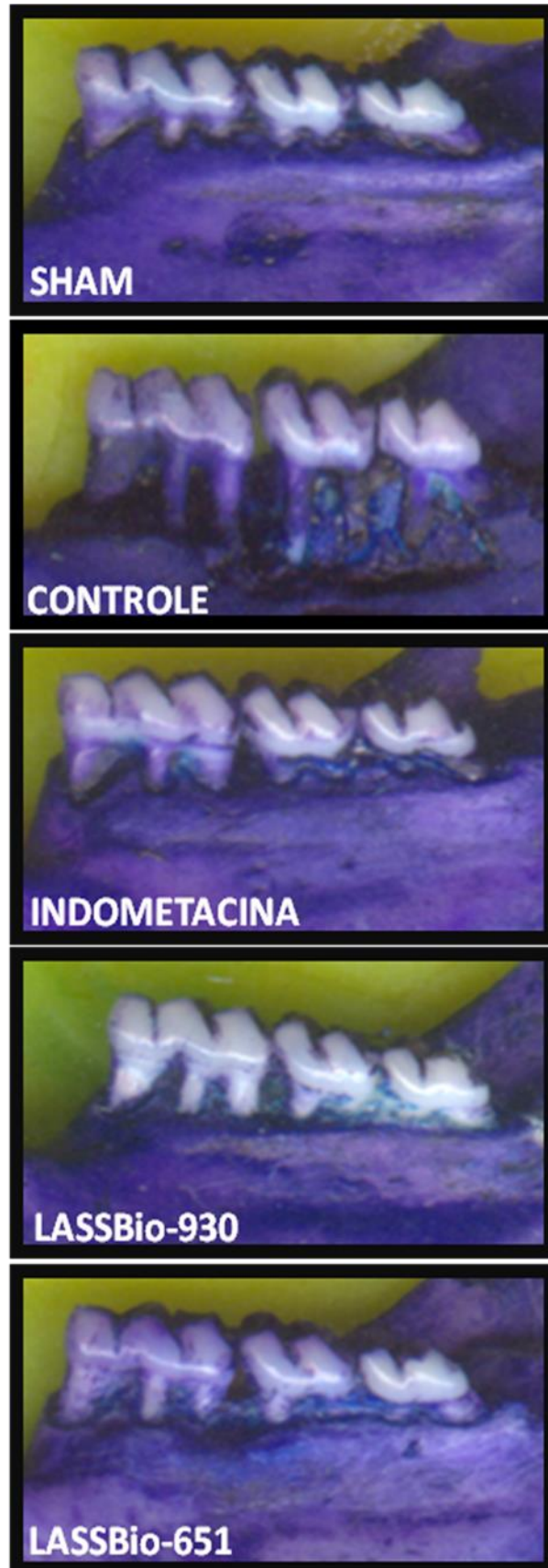
Após 11 dias da colocação da ligadura, com administração do veículo do 5° ao 10° dia, a média das distâncias obtidas para o grupo controle foi 79,2% maior em comparação ao grupo sham ( $6,23 \pm 0,39$  vs.  $3,48 \pm 0,26$  mm, respectivamente), indicando que a doença havia sido estabelecida.

Com o intuito de validar esta metodologia para o estudo de compostos com atividade anti-inflamatória, um outro grupo de animais foi tratado com a indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ), praticamente retornando ao nível de perda óssea alveolar considerado basal, obtido no grupo sham. A perda óssea alveolar comparada ao grupo controle foi reduzida em 92,4% ( $3,69 \pm 0,10$  mm).

Prosseguimos com a avaliação dos compostos *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651, para ambos foi administrada uma dose de  $100 \mu\text{mol/kg}$ . O tratamento com as substâncias apresentou redução da perda óssea alveolar de 58,4% ( $4,67 \pm 0,25$  mm) e 65,3% ( $4,44 \pm 0,17$  mm), respectivamente.



**Gráfico 2 – Perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular.** Administração v.o. do veículo (PBS+tween 80 1% e DMSO 2%), indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ) ou das substâncias teste ( $100 \mu\text{mol/kg}$ ), uma vez ao dia, do 5° ao 10° dia após indução da doença. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM da perda óssea (mm) (somatório das distâncias entre a crista do osso alveolar e a junção cimento-esmalte de todos os molares) ( $***p < 0,001$ . One-way-ANOVA, Bonferroni).



**Figura 24 –** Imagens representativas da análise macroscópica de perda óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular. Administração v.o. do veículo (PBS+tween 80 1% e DMSO 2%), indometacina (14  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou das substâncias teste (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), uma vez ao dia, do 5° ao 10° dia após indução da doença.

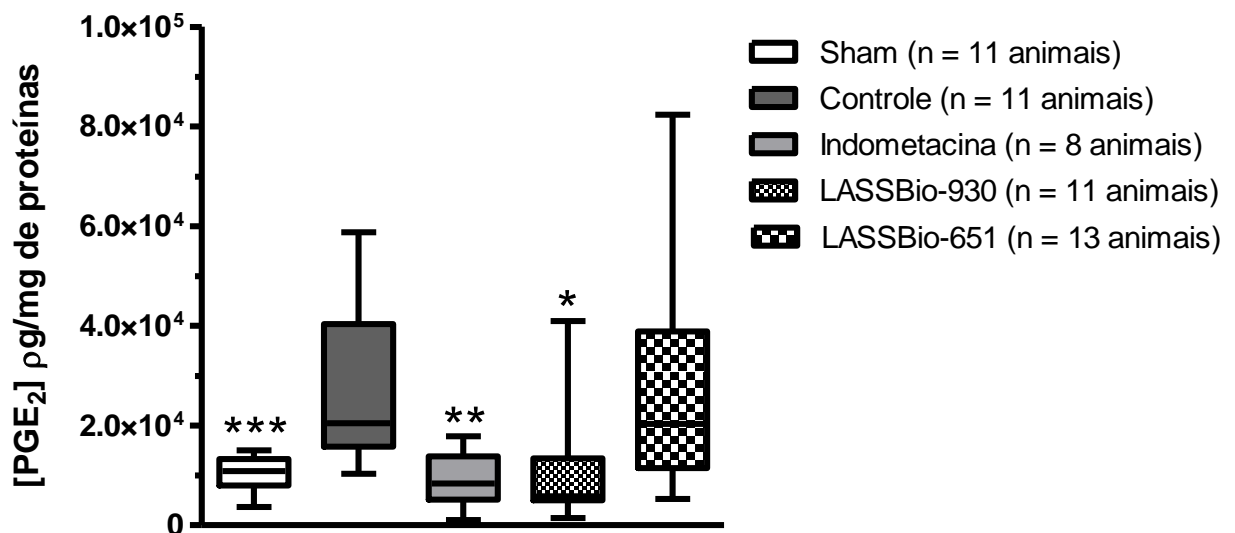


### 5.1.3 DOSAGENS BIOQUÍMICAS A PARTIR DO TECIDO GENGIVAL

#### 5.1.3.1 PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>

Após o período experimental e processamento do tecido gengival, as concentrações de PGE<sub>2</sub> foram dosadas, demonstrando aumento significativo deste prostanoide no grupo controle, em comparação ao grupo sham ( $2,04 \times 10^4$  vs.  $1,1 \times 10^4$  pg/mg de proteínas, respectivamente).

O tratamento com indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ) foi efetivo na redução da concentração de PGE<sub>2</sub> ( $0,84 \times 10^4$  pg/mg de proteínas), assim como o tratamento com o derivado LASSBio-930 ( $0,58 \times 10^4$  pg/mg de proteínas). O composto LASSBio-651 não reduziu as concentrações da PGE<sub>2</sub> ( $2,03 \times 10^4$  pg/mg de proteínas) (Gráfico 3)



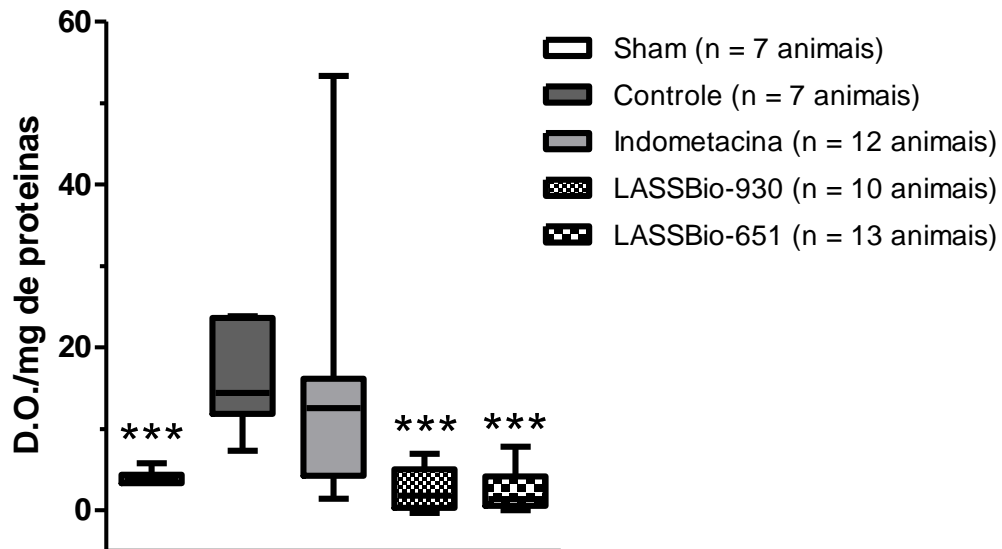
**Gráfico 3 – Prostaglandina E<sub>2</sub> no tecido gengival.** Razão da concentração de prostaglandina E<sub>2</sub> (pg/mL) pela concentração de proteínas totais (mg/mL) dosadas do tecido gengival de ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular. Administração v.o. do veículo (PBS+tween 80 1% e DMSO 2%), indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ) ou das substâncias teste ( $100 \mu\text{mol/kg}$ ), uma vez ao dia, do 5° ao 10° dia após indução da doença (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Mann Whitney teste).

#### 5.1.3.2 MIELOPEROXIDASE

Os animais submetidos à indução da periodontite experimental apresentaram aumento significativo nas concentrações de mieloperoxidase, expressa pela D.O./mg de proteínas, quando comparado ao grupo sham ( $14,39$  vs.  $3,89$ , respectivamente).

O tratamento dos animais com a indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ) não foi efetivo na redução desta enzima no tecido gengival ( $12,56$ ), enquanto o tratamento com os derivados LASSBio-930 ( $100 \mu\text{mol/kg}$ ) e LASSBio-651 ( $100 \mu\text{mol/kg}$ ) induziu

significante diminuição nas concentrações da mieloperoxidase (1,78 e 1,36, respectivamente) (Gráfico 4).



**Gráfico 4 – Mieloperoxidase no tecido gengival.** Razão da densidade ótica (D.O.) de mieloperoxidase pela concentração de proteínas totais (mg/mL) dosadas do tecido gengival de ratos com periodontite induzida por ligadura do primeiro molar mandibular. Administração v.o. do veículo (PBS+tween 80 1% e DMSO 2%), indometacina (14  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou das substâncias teste (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), uma vez ao dia, do 5° ao 10° dia após indução da doença (\*\* $p < 0,001$ , Mann Whitney teste).

#### 5.1.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS PERIODONTAIS

**GRUPO SHAM** (Figura 25, A e F) – A análise das lâminas histológicas do grupo sham demonstrou ausência ou discreta presença de infiltrado inflamatório na região mesial (lateral esquerda à primeira raiz do primeiro molar mandibular), papilas preservadas e epitélio com morfologia usual, dentro dos padrões da normalidade. Na região de furca (região entre as raízes do primeiro molar) observamos os constituintes normais do tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos. Na região distal (região entre o primeiro e segundo molares mandibulares), nota-se a presença de infiltrado inflamatório moderado concentrado na superfície do epitélio, predominantemente composto por neutrófilos, em decorrência da presença de bactérias entre os molares.

**GRUPO CONTROLE** (Figura 25, B e G) – Na região mesial do primeiro molar dos animais controle observou-se perda das papilas, intenso infiltrado inflamatório misto e exocitose de neutrófilos. A região de furca apresentou infiltrado inflamatório moderado a intenso e lesões com exposição desta área para a cavidade oral, em

decorrência da reabsorção óssea. Houve retração gengival e observou-se bactérias próximas ao epitélio, que se encontrava atrófico. Na região distal, as papilas perderam sua morfologia, o epitélio se encontrava atrófico e achatado, observou-se infiltrado inflamatório moderado a intenso e a presença de colônias bacterianas sobre o epitélio.

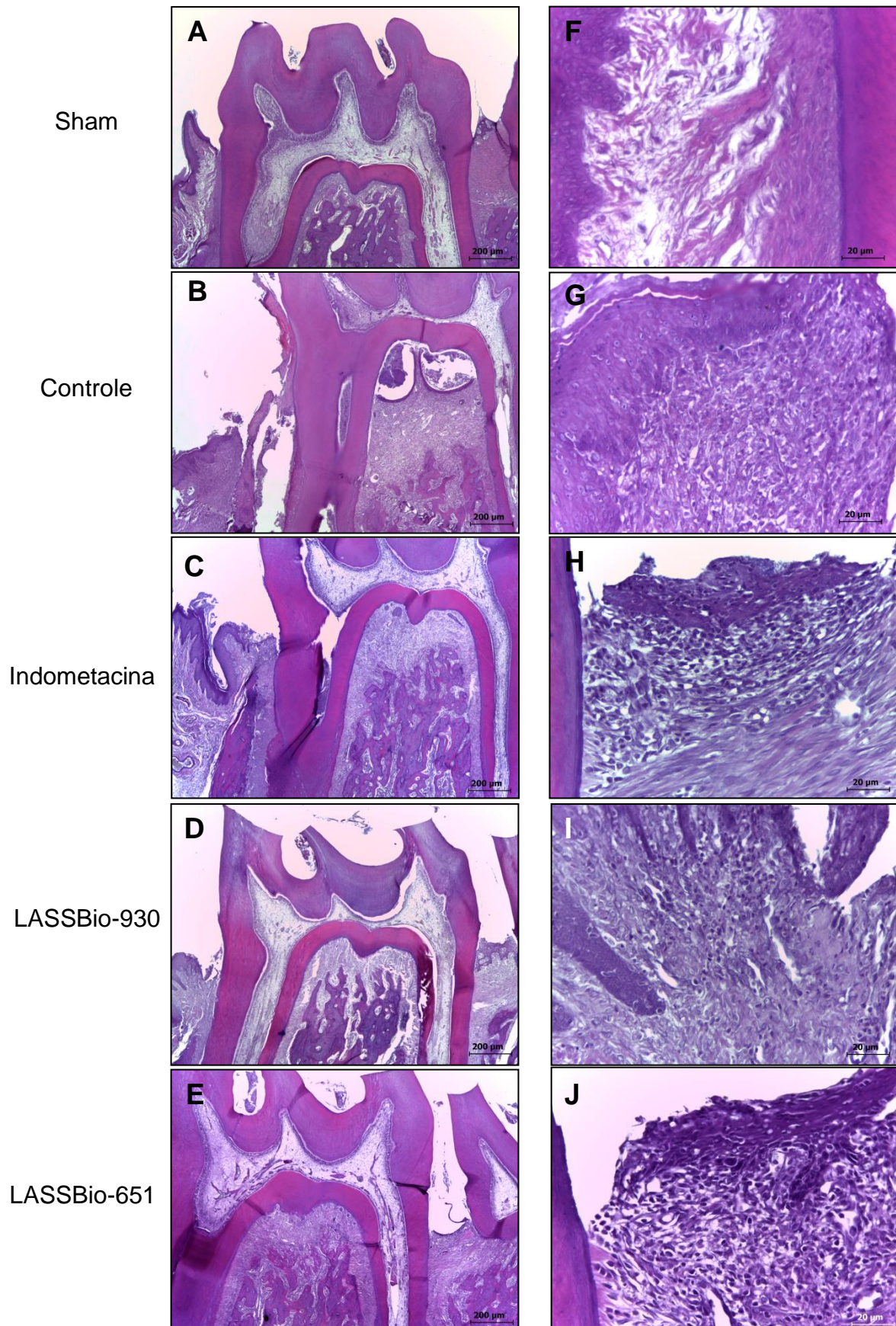
INDOMETACINA (Figura 25, C e H) – Os animais tratados com indometacina demonstraram papilas preservadas, com o epitélio atrófico próximo ao dente, com exocitose de neutrófilos e infiltrado inflamatório moderado misto na região mesial. A área de furca estava dentro dos padrões da normalidade, apresentando tecido conjuntivo fibroso denso. Na região distal observou-se infiltrado inflamatório concentrado abaixo do epitélio, que se encontrava atrofiado e com exocitose de neutrófilos; as papilas perderam sua morfologia.

LASSBio-930 (Figura 25, D e I) – A região mesial demonstrou papilas preservadas, infiltrado inflamatório discreto e crônico, sem sinais de exocitose. A região de furca estava dentro dos padrões da normalidade; na região distal observou-se atrofia do epitélio, infiltrado inflamatório moderado misto, concentrado próximo ao epitélio, que apresentava exocitose de neutrófilos.

LASSBio-651 (Figura 25, E e J) – A região mesial demonstrou papilas preservadas, infiltrado inflamatório discreto misto, sem sinais de exocitose. A região de furca estava dentro dos padrões da normalidade; na região distal observou-se atrofia do epitélio, infiltrado inflamatório discreto a moderado, misto, predominantemente crônico, concentrado próximo ao epitélio, que apresentou exocitose de neutrófilos discreta.

#### 5.1.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ESTÔMAGOS

A análise macroscópica da mucosa do estômago dos animais realizada 24 horas após seis dias de administração por via oral do veículo ou dos derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 na dose de 100 µmol/kg mostrou que nenhum deles induziu a formação de lesões pontuais ou hemorrágicas. Os animais tratados com a indometacina na dose de 14 µmol/kg também não demonstraram lesões gástricas. No entanto, os animais que morreram durante o período experimental apresentaram essas lesões.



**Figura 25 – Cortes histológicos longitudinais a partir da hemi-mandíbula esquerda dos animais.** Imagens representativas dos grupos sham (A, F), controle (B, G), tratados com indometacina (14 µmol/kg/dia) (C, H), com o derivado LASSBio-930 (100 µmol/kg/dia) (D, I) e LASSBio-651 (100 µmol/kg/dia) (E, J). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina; aumento de 4X (A-E) e de 40X na região das papilas (F-J).

## 6 DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos do periodonto, envolvendo interações entre produtos bacterianos, células do hospedeiro e mediadores inflamatórios (THOMAS & PULEO, 2010). Além da alta taxa de prevalência nos indivíduos (15-20% da população mundial adulta) (OMS, 2012), diversos estudos indicam associações às doenças crônicas sistêmicas, como artrite reumatoide, diabetes mellitus, doenças respiratórias e cardiovasculares (KUO *et al.*, 2008), aumentando a necessidade de maior compreensão desta patologia e pela busca de novas terapias farmacológicas a serem empregadas.

Estudos demonstram que o emprego de AINEs seletivos e não seletivos das isoformas de COX contribuem para a redução da destruição periodontal em modelos animais e promovem melhora dos parâmetros clínicos em humanos (GRAVES *et al.*, 2012). Além disso, elevadas concentrações de PGs, particularmente a PGE<sub>2</sub>, são detectadas no tecido gengival e em FCG de pacientes com periodontite, permitindo associações entre os níveis deste prostanoide e a gravidade da doença (GOODSON *et al.*, 1974; OFFENBACHER *et al.*, 1984; NAKASHIMA *et al.*, 1994; TSAI *et al.*, 1998). Em estudos recentes em colaboração com a Prof. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Camargo observamos que a concentração de PGE<sub>2</sub> no FCG em pacientes com gengivite foi significativamente menor em comparação aos pacientes com periodontite crônica (dados não publicados).

No presente trabalho foram avaliados, em um modelo bem estabelecido de periodontite em ratos, dois protótipos de candidatos a fármacos planejados e sintetizados no LASSBio, os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651, previamente caracterizados por nosso grupo de pesquisa através de estudos *in vitro* e por suas atividades anti-inflamatórias em modelos animais clássicos de inflamação, que sugerem um mecanismo de ação por inibição não seletiva da COX para LASSBio-930 (TRIBUTINO, 2008; TRIBUTINO *et al.*, 2009) e inibição não seletiva da COX e de TNF- $\alpha$  para LASSBio-651 (dados não publicados). Iniciamos o tratamento dos animais após a periodontite já estabelecida, ou seja, a partir do quinto dia após a indução da doença, correlacionando mais fidedignamente com o observado na clínica.

Para avaliarmos a perda óssea alveolar, utilizamos um método macroscópico no qual são somadas as distâncias entre a crista do osso alveolar e a junção

cemento-esmalte da face lingual das raízes dos três molares mandibulares (CRAWFORD *et al.*, 1978). Observamos para o grupo controle (grupo com a doença) uma acentuada perda óssea alveolar e conseqüente exposição das raízes dos dentes, o que não foi observado no grupo sham (grupo sem a doença).

As análises histológicas das lâminas montadas a partir de cortes longitudinais da hemi-mandíbula esquerda dos animais demonstraram intensa reabsorção óssea na área de furca, tecidos comprometidos e intenso infiltrado inflamatório no grupo controle, enquanto o grupo sham apresentou papilas intactas e infiltrado inflamatório ausente ou discreto. A visualização microscópica corrobora o resultado obtido na análise macroscópica de perda óssea, indicando que a doença foi estabelecida e o modelo implantado com sucesso.

A indometacina, um AINE clássico, inibidor não seletivo das isoformas da COX, foi utilizada para a validação do modelo de periodontite experimental em ratos visando a comparação de substâncias com atividade anti-inflamatória. A sua administração reduziu significativamente a perda óssea alveolar (92,4%) em comparação ao grupo controle, reproduzindo os achados de Azoubel e colaboradores (2007), que empregaram o mesmo desenho experimental e dose de indometacina utilizados nesse estudo. Este efeito se deve ao bloqueio da biossíntese de PGs, confirmado pela redução significativa da concentração de PGE<sub>2</sub> no tecido gengival dos animais tratados com esse AINE, acarretando numa menor indução de osteoclastogênese e reabsorção óssea já descritas (BEZERRA *et al.*, 2000; AZOUBEL *et al.*, 2007; KU *et al.*, 2010).

O tratamento por via oral com os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 inibiu significativamente a perda óssea alveolar em 58,4% e 65,3%, respectivamente, e a análise histológica demonstrou a presença de infiltrado inflamatório discreto a moderado, mais concentrado na região abaixo do local da ligadura, possivelmente causado pela permanência do fio durante o período experimental.

A partir das amostras de tecido gengival dos animais tratados com o composto LASSBio-930 observou-se uma redução significativa dos níveis de PGE<sub>2</sub>, o que não foi observado no tecido gengival dos animais tratados com o composto LASSBio-651.

A reabsorção óssea alveolar é regulada por citocinas e mediadores pró-inflamatórios, dentre eles a PGE<sub>2</sub>, que estimulam osteoblastos periosteos,

fibroblastos gengivais, linfócitos TCD4+ e linfócitos B a expressarem RANKL. Essa proteína interage com seu receptor nos pré-osteoclastos, RANK, levando a diferenciação dos mesmos a osteoclastos maduros. Em tecidos saudáveis existe um balanço entre as concentrações de RANKL e a OPG, uma proteína que se liga ao RANKL, impedindo que este ative o RANK nos pré-osteoclastos, equilibrando a deposição e reabsorção óssea. Em condições inflamatórias, esse desbalanço ocorre não só devido ao aumento da expressão de RANKL, mas também pela redução da expressão da OPG e pelo estímulo direto à maturação dos pré-osteoclastos (GRAVES *et al.*, 2011a).

A capacidade de LASSBio-930 em diminuir a concentração da PGE<sub>2</sub> no tecido gengival dos animais com periodontite constitui mais um indicativo de que o mecanismo de ação desse derivado se deve em parte pela inibição das isoformas de COX, corroborando os resultados de Tributino (2008), que demonstrou relevante atividade anti-inflamatória em diferentes modelos de inflamação em animais, tais como a artrite induzida por adjuvante completo de Freund e edema de pata induzido por carragenina em ratos e edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.

Apesar do tratamento com o derivado LASSBio-651 não ter sido efetivo na redução da concentração de PGE<sub>2</sub> no tecido gengival, estudos prévios demonstraram a capacidade de LASSBio-651 em inibir a produção de PGE<sub>2</sub> no exsudato inflamatório provocado por carragenina no modelo de *air pouch*. Além do exposto, LASSBio-651 apresentou importante atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (artrite, edema e pleurisia), e capacidade de inibir a produção de TNF- $\alpha$  *in vitro* a partir de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS. LASSBio-930 não apresenta esse efeito sobre o a produção de TNF- $\alpha$ .

Existe um grande número de evidências demonstrando que o TNF- $\alpha$  tem um papel importante na progressão da doença e destruição dos tecidos periodontais (IKEZAWA *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  parece interferir no metabolismo ósseo não só pelo estímulo à formação de osteoclastos, mas também reduzindo o número de osteoblastos (redução da proliferação, aumento da apoptose ou inibindo a diferenciação) (LIN *et al.*, 1994; TSUBOI *et al.*, 1999; WEI *et al.*, 2005).

A administração de antagonistas de IL-1/TNF- $\alpha$  em modelos de periodontite em animais inibiram o recrutamento celular, a perda óssea alveolar e a formação de osteoclastos, bem como a formação do infiltrado inflamatório próximo à crista do

osso alveolar (ASSUMA *et al.*, 1998; GRAVES *et al.*, 1998). O uso do etanercept, um antagonista de TNF- $\alpha$ , reduziu a perda óssea, o infiltrado inflamatório, a injúria tecidual e a atividade da MPO em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos (DI PAOLA *et al.*, 2007).

Portanto, a capacidade do derivado LASSBio-651 em inibir a produção de TNF- $\alpha$  poderia explicar os efeitos observados sobre os parâmetros avaliados na periodontite.

Os AINEs não são empregados comumente no tratamento e prevenção da periodontite em razão dos efeitos colaterais dessa classe de fármacos sobre o trato gastrointestinal (úlceras gástricas), em decorrência da inibição da COX na mucosa gástrica com conseqüente redução de PGs, prejudicando assim a citoproteção. A administração de AINEs por longos períodos podem causar mais danos do que a própria doença a ser tratada, isso implica na carência de estudos de longo prazo, sobretudo em humanos, que comprovem o potencial benéfico da utilização dos AINEs na periodontite (GURGEL *et al.*, 2004)

Os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-930 e LASSBio-651 apresentam um padrão molecular distinto dos AINEs disponíveis no mercado e apesar do suposto mecanismo de ação destes derivados passar pela inibição da COX, o tratamento crônico dos animais não mostrou alterações clínicas visíveis, bem como sinais de gastroirritação, como as descritas na literatura e também observadas no tratamento com a indometacina.

O efeito gastroirritante da indometacina é bem estabelecido em conseqüência de seus mecanismos de ação (HART, 1965; MITCHELL *et al.*, 1993). No nosso estudo foi observada uma alta mortalidade (33%) nos grupos de animais tratados com a indometacina, que está associada a esse efeito colateral. No entanto, os animais que sobreviveram aos seis dias de tratamento com a indometacina (14  $\mu$ mol/kg) não apresentaram lesões gástricas, embora não tenham ganhado peso em comparação ao grupo controle e nitidamente apresentavam-se abatidos, com alterações comportamentais. Polat e colaboradores (2010) observaram a adaptação da mucosa gástrica contra a toxicidade da indometacina administrada cronicamente em ratos wistar por 14 dias, em comparação à administração de uma única dose elevada. A adaptação gástrica é uma resistência aumentada da mucosa após danos repetidos e isto pode ter ocorrido com os animais sobreviventes do grupo da indometacina.



Estudos demonstram que a atividade da enzima MPO está aumentada no FCG de pacientes com doença periodontal e que seus níveis podem ser correlacionados ao estado clínico da doença (HERNANDEZ *et al.*, 2010; MARCACCINI *et al.*, 2010). A MPO é uma enzima lisossomal abundante nos grânulos de neutrófilos azurofílicos liberada durante o estresse oxidativo que catalisa a formação de ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio. A MPO constitui aproximadamente 5% do conteúdo proteico dos neutrófilos e é utilizada como medida indireta do infiltrado dessas células para o tecido (LLORET & MORENO, 1995).

A cinética da participação neutrofílica no modelo de periodontite experimental em ratos induzida pela ligadura é descrita na literatura. Análises histológicas dos tecidos periodontais de animais submetidos à doença demonstraram que o infiltrado celular é constituído principalmente por neutrófilos até o quarto dia após a indução (BEZERRA *et al.*, 2000).

O tecido gengival retirado da hemi-mandíbula direita dos animais também foi submetido à dosagem da MPO. Os animais controle apresentaram maior atividade dessa enzima, indicando assim um maior infiltrado neutrofílico em comparação ao grupo sham, em acordo com o que foi previamente descrito na literatura (GUIMARÃES *et al.*, 2007; BRIGUGLIO *et al.*, 2010; KU *et al.*, 2010). Gomes e colaboradores (2009) demonstraram que a atividade de MPO no tecido gengival de ratos com periodontite induzida pela ligadura apresentou um pico no sétimo dia após a indução da doença, se mantendo elevado até o trigésimo dia.

O tratamento com a indometacina, embora tenha sido efetivo na preservação óssea e dos tecidos periodontais, não diminuiu a atividade da MPO. Esse resultado vai de encontro ao descrito na literatura, em que a atividade de MPO no tecido gengival de ratos com periodontite induzida pela ligadura do segundo molar maxilar e tratados com indometacina (2,8  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi significativamente menor em comparação ao grupo sem a doença (KU *et al.*, 2012). No entanto, na literatura a indometacina foi administrada 24 horas antes da indução da doença e durante nove dias subsequentes à colocação da ligadura. Deste modo, existem diferenças no desenho experimental, já que optamos por um tratamento curativo, com a doença já estabelecida. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que, com o bloqueio das ciclo-oxigenases, a via de metabolização do ácido araquidônico esteja sendo deslocada para a das lipoxigenases, levando a formação de leucotrienos, que

estimulam o recrutamento de leucócitos na resposta inflamatória, como justificado por Kornman e colaboradores (1990), após verificarem que a aplicação tópica do ácido meclofenâmico em macacos com periodontite induzida por ligadura levou ao aumento de neutrófilos no sulco gengival, embora tenha inibido a perda óssea alveolar.

Desta forma, é possível inferir que os neutrófilos aparentemente continuam migrando para o local da inflamação e fagocitando/destruindo as bactérias ali presentes. A inibição das isoformas da COX nos neutrófilos e em outras células inflamatórias, bem como nas células do periodonto, resulta na redução das concentrações de PGE<sub>2</sub>, o que favorece a inibição de reabsorção óssea alveolar, levando a um nível ósseo nesse grupo similar ao encontrado para o grupo sham.

A avaliação da atividade da enzima MPO a partir do tecido gengival coletado das hemi-mandíbulas dos animais tratados com os derivados LASSBio-930 e LASSBio-651 demonstrou diminuição significativa em comparação ao grupo controle, indicando menor infiltrado de neutrófilos no tecido.

Além da liberação da MPO, o infiltrado neutrofílico desencadeia a liberação de outros mediadores inflamatórios (incluindo citocinas e prostaglandinas) que perpetuam a inflamação e promovem a desregulação do metabolismo ósseo, estimulando a ativação de osteoclastos (DENNISON & VAN DYKE, 1997); a deficiência de neutrófilos pode ser prejudicial à resolução do processo inflamatório, uma vez que fagocitam os micro-organismos, no entanto, a resposta exacerbada pode causar dano tecidual e prolongar a extensão e gravidade do processo inflamatório nas doenças periodontais (SCOTT & KRAUSS, 2012).

Portanto, é possível sugerir que os derivados LASSBio-930 e LASSBio-651 também participem da modulação da resposta inflamatória pela diminuição do infiltrado neutrofílico, embora não possamos descartar a possibilidade de uma inibição direta da MPO pelas substâncias avaliadas.

A inibição de perda óssea e a redução do infiltrado inflamatório nos tecidos do periodonto conferidos pelo tratamento com o derivado LASSBio-930 parecem estar relacionadas à inibição da COX, com conseqüente redução das concentrações de PGE<sub>2</sub>, impedindo assim a reabsorção óssea alveolar e a destruição tecidual, enquanto o derivado LASSBio-651 parece também atuar na inibição da liberação de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória relacionada à progressão da doença periodontal.

As moléculas avaliadas foram planejadas como anti-inflamatórias, mas o grupamento *N*-acilidrazona presente na estrutura dos derivados LASSBio-930 e LASSBio-651 é uma subunidade privilegiada e pode estar atuando em outros alvos, por outros mecanismos de ação, que favoreçam as atividades observadas.

Os derivados LASSBio-930 e LASSBio-651 não afetaram o peso corporal e o comportamento dos animais durante o período experimental, não foram gastroirritantes e demonstraram ser protótipos de candidatos a fármacos úteis como adjuvantes no tratamento da doença periodontal.

## 7 CONCLUSÕES

Os derivados *N*-acilidrazônicos com propriedades anti-inflamatórias LASSBio-930 e LASSBio-651 inibiram a perda óssea alveolar e diminuíram o infiltrado inflamatório em comparação aos animais controle. As dosagens de mieloperoxidase a partir do tecido gengival indicaram que os compostos possivelmente impediram a migração de neutrófilos. Apenas o derivado LASSBio-930 reduziu as concentrações de PGE<sub>2</sub> dosadas do tecido gengival. Ademais, o tratamento crônico dos animais com os derivados anti-inflamatórios LASSBio-930 e LASSBio-651 não apresentou sinais de gastroirritação. Os compostos avaliados são protótipos de fármacos anti-inflamatórios com padrão molecular distinto dos AINES disponíveis no mercado, sendo potencialmente úteis para o tratamento adjuvante da doença periodontal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOODI, G.M.; GOLDBERG, M.B.; GLOGAUER, M.; Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype. **J Periodontol.** 82(5):726-33, 2011.

ACADEMIA AMERICANA DE PERIODONTIA. **Glossary of Periodontal Terms.** Michigan: The American Academy of Periodontology, 2011. Disponível em: <<http://www.perio.org>>. Acesso em: 01 out. 2012.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Rev Immunol.** 4 (7):499-511, 2004.

ANDREWS, P.C.; KRINSKY, N.I.; Quantitative determination of Myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. **Analytical Biochemistry.** 127(2):346-350, 1982.

ARMITAGE, G.C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Ann Periodontol.** 4 (1): 1-6, 1999.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D. *et al.* IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Antiinflammatory Response and Bone Loss In Experimental Periodontitis. **J Immunol.** 160: 403-409, 1998.

AZOUBEL, M.C.F.; MENEZES, A.M.A.; BEZERRA, D.; ORIA, R.B.; BRITO, G.A.C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res.** 40:117-125, 2007.

AZUMA, M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. **J Periodontal Res.** 41: 361–73, 2006.

BAELUM, V.; FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Periodontal diseases in adult Kenyans. **J Clin Periodontol.**15: 445-52, 1988.

BAKER, P. J.; DIXON, M.; EVANS, R. T.; . CD4(+) T Cells and The Proinflammatory Cytokines Gamma Interferon and Interleukin-6 Contribute to Alveolar Bone Loss in Mice. **Infect Immunol.** 67: 2804-2809, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova.** 25 (1): 129-148, 2002.

BARTOLD, P. M.; WALSH, L. J.; NARAYANAN, A.S. Molecular and cell biology of the gingiva. **Periodontology** 2000. 24: 28–55, 2000.

BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GÜRGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y.T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J Dent Res.** 86 (4): 347-351.2007.

BELIBASAKIS, G.N.; GUGGENHEIM, B. Induction of Prostaglandin E<sub>2</sub> and Interleukin-6 in gingival fibroblasts by oral biofilms. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 63: 381–386, 2011.

BERGLUNDH, T; DONATI, M.; Aspects of adaptive host response in periodontitis. **J Clin Periodontol.** 32(6):87–107, 2005.

BEZERRA, M.M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V.B.M.; VIEIRA, I.B.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.** 71:1009-1014, 2000.

BRIGUGLIO, E.; DI PAOLA, R.; PATERNITI, I.; MAZZON, E.; OTERI, G.; CORDASCO, G.; CUZZOCREA, S. WY-14643, a Potent Peroxisome Proliferator Activator Receptor- $\alpha$  PPAR- $\alpha$  Agonist Ameliorates the Inflammatory Process Associated to Experimental Periodontitis. **PPAR Res.** 2010, 2010.

BRINKMANN, V.; LAUBE, B.; ABU ABED, U.; GOOSMANN, C.; ZYCHLINSKY, A.; Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. **J Vis Exp.** 36: 1724, 2010.

BUDUNELI, N.; KINANE D.F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **J Clin Periodontol.** 38 (11): 85–105, 2011.

CARDOSO, C.R.; GARLET, G.P.; CRIPPA, G.E.; ROSA, A.L.; JUNIOR, W.M.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. **Oral Microbiol Immunol.** 24:1–6, 2009.

CARRANZA, F.A.; BERNARD, G.W. **The Tooth Supporting Structures.** Clinical Periodontology, Elsevier, 11<sup>a</sup> ed., cap.2, 2012.

CATON, A. J.; RYAN, B. M. E.; Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). **Pharmacological Research.** 63:114–120, 2011.

CAVANAUGH JR P.F.; MCDONALD, J.S.; PAVELIC, L.; LIMARDI, R.J.; GLUCKMAN, J.L.; PAVELIC, Z.P. Immunohistochemical Localization of Prostaglandin h Synthase Isoenzyme Proteins in The Gingival Tissue of Patients with Periodontitis. **Inflammopharmacology.** 3:109-119. 1995.

COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol.** 79(8)1569-1576, 2008.

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

DELIMA, A.J.; KARATZAS, S.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. **J Infect Dis.** 86 (4): 511-516, 2002.

DELIMA, A.J.; OATES, T.; ASSUMA, R.; SCHWARTZ, Z.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol.** 28: 233–240, 2001.

DENNISON, D.K.; VAN DYKE, T.E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. **Periodontol 2000.** 14:54-78, 1997.

DEO, V.; BHONGADE, M.L. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. **Dent Today.** 29 (9): 60-66, 2010.

DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; MUIÁ, C. *et al.* Effects of Etanercept, a tumor necrosis factor- $\alpha$  Antagonist, in an Experimental Model of Periodontitis In Rats. **Br. J. Pharmacol.** 150: 286-297, 2007.

DRISKO, C.H.; Nonsurgical periodontal therapy. **Periodontology 2000.** 25:77-88, 2001.

DUARTE, C.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Privileged Structures: a Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. **Mini - Reviews in Medicinal Chemistry.** 7: 1108-1119, 2007.

DUMITRESCU, A.L.; TANAKA, M. **Aspects of innate host response in Periodontal Disease.** Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease, Springer, 1<sup>a</sup> ed., cap.3, 2010.

FERNANDES, L.A.; MARTINS, T.M.; ALMEIDA, J.M.; NAGATA, M.J.; THEODORO, L.H.; GARCIA, V.G.; BOSCO, A.F. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. **J Appl Oral Sci.** 18 (6): 635-640, 2010.

FITZSIMMONS, T. R.; SANDERS, A. E.; BARTOLD, P. M.; SLADE, G.D. Local and systemic biomarkers in gingival crevicular fluid increase odds of periodontitis. **J of Clin Periodontol.** 37: 30–36, 2010.

FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Curr Med Chem.** 13(2):167-98, 2006.

FRENKEL, J.K. Models for infectious diseases. **Fed Proc.** 28(1):179-90, 1969.

GARLET, G.P.; CARDOSO, C.R.; FERREIRA, B.R.; ÁVILA-CAMPOS, M.J.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiol Immunol.** 21:12-20, 2006.

GIANNOBILE, W.V.; Host-response therapeutics for periodontal diseases. **J Periodontol.** 79(8):1592-600, 2008.

GOMES, PIRES JR; ZUZA, E.P.; MUSCARA, M.N.; HERRERA, B.S.; SPOLIDORIO, L.C.; TOLEDO, B.E.; SPOLIDORIO, D.M. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. **Immunol Invest.** 38(2):117-22, 2009.

GOODSON, J.M.; DEWHIRST, F.E.; BRUNETTI, A. Prostaglandin E<sub>2</sub> Levels and Human Periodontal Disease. **Prostaglandins.** 6 (1): 81-85, 1974.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology.** 17(3), 2011b.

GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. **J Periodontol.** 79 (suppl.8): 1585-1591, 2008.

GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol.** 74 (3): 391-401, 2003.

GRAVES, D.T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K.; ROSSA, C.J. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol.** 15:117-32, 2011a.

GRAVES, D.T.; LI, J.; COCHRAN, D.L. Inflammation and Uncoupling as Mechanisms of Periodontal Bone Loss. **J Dent Res.** 90 (2): 143–153, 2011.

GRAVES, D.T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K.; ROSSA, C. Jr. Front Oral Biol. 2012;15:117-32. Epub 2011 Nov 11. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol.** 15:117-32, 2012.

GRONERT, K.; KANTARCI, A.; LEVY, B.D.; CLISH, C.B.; ODPARLIK, S.; HASTURK, H.; BADWEY, J.A.; COLGAN, S.P.; VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. A molecular defect in intracellular lipids signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. **J Immunol.** 1;172(3):1856-61. 2004.

GUIMARÃES, M.R.; NASSAR, P.O.; ANDIA, D.C.; NASSAR, C.A.; SPOLIDORIO, D.M.; ROSSA, C. JR.; SPOLIDORIO, L.C. Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. **Arch Oral Biol.** 52 (9): 882-8, 2007.



GURGEL, B.C.V.; PINTO, F.R.; SALLUM, E.A.; NOCITI Jr, F.H.; CASATI, M.Z.; TOLEDO, S. Perspectivas da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais na terapia periodontal. **Rev. Periodontia**. 14(2): 12-4, 2004.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontology** 2000. 5 (1): 7-25, 1994a.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontology** 2000. 5(1): 78-111, 1994b.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S., PATEL, M.R.; SONG, X. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral Microbiol Immunol**. 23 (3): 196-205, 2008.

HANS, M.; HANS, V. M. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. **J of Oral Science**. 53 (3): 263-271, 2011.

HARRINGTON, L.E.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; TURNER, H.; MURPHY, T.L.; MURPHY, K.M.; WEAVER, C.T. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**. 6:1123–1132, 2005.

HART, F.D. Indomethacin and gastric ulcer. **Br Med J**. 2 (5468):1000-1, 1965.

HEASMAN P.A., BENN D.K., KELLY P.J., SEYMOUR R.A., AITKEN D. The use of topical flurbiprofen as an adjunct to non-surgical management of periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 20: 457-464, 1993.

HERNÁNDEZ, M. GAMONAL, J.; TERVAHARTIALA, T.; MÄNTYLÄ P.; RIVERA, O.; DEZEREGA, A.; DUTZAN, N.; SORSA, T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. **J Periodontol**. 81(11): 1644-1652, 2010.

HINRICHS, J.E.; NOVAK, M.J. **Classification of diseases and conditions affecting the periodontium**. Clinical Periodontology, Elsevier, 11<sup>a</sup> ed., p. 104, 2012.

HERRERA, B.S.; MARTINS-PORTO, R.; MAIA-DANTAS, A.; CAMPI, P.; SPOLIDORIO, L.C.; COSTA, SK.; VAN DYKE, T.E.; GYURKO, R.; MUSCARA, M.N. iNOS-derived nitric oxide stimulates osteoclast activity and alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol**. 82 (11): 1608-1615, 2011.

HOLT, S.C.; EBERSOLE, J.L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontology** 2000. 38:72-122, 2005.

HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, D.M.; MUSCARA, M.N.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L.C. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. **J Periodontal Res**. 40:208-211, 2005.

HOLZHAUSEN, M; ROSSA JR, C.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; NASSAR, P.O.; SPOLIDÓRIO, D.M.; SPOLIDÓRIO, L.C. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.** 73:1030-1036, 2002.

HOWELL, T.H.; JEFFCOAT, M.K.; GOLDHABER, P.; REDDY, M.S.; KAPLAN, M.L.; JOHNSON, H.G.; HALL, C.M.; WILLIAMS, R.C. Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. **J Periodontal Res.** 26(6):498-501, 1991.

IKEZAWA I, TAI H, SHIMADA Y, KOMATSU Y, GALICIA JC, YOSHIE H. Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and 2 in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 32(10):1047-54, 2005.

JEFFCOAT, M.K., REDDY M.S., HAIGH S. A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. **J Periodontol.** 66(5): 329-338, 1995.

JEFFCOAT, M.K.; WILLIAMS, W.J.; WECHTER, H.G.; JOHNSON, H.G.; KAPLAN, J.S.; GANDRUP, J.S. Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles. **J Periodontal Res.** 21:624-33, 1986.

JORDAN, H.V. Rodent model systems in periodontal disease research. **J Dent Res.** 50(2):236-42, 1971.

KENNEDY, A.D.; DELEO, F.R.; Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol Res.** 43(1-3):25-61, 2009.

KEREMI, B.; LOHINAI, Z.; KOMORA, P.; DUHAJ, S.; BORSI, K.; JOBBAGY-OVARI, G.; KALLO, K.; SZEKELY, A.D.; FAZEKAS, A.; DOBO-NAGY, C.; SIKIRIC, P.; VARGA, G. Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. **J Physiol Pharmacol.** 7: 115-122, 2009.

KIKKERT, R.; LAINE, M.L.; AARDEN, L.A.; VAN WINKELHOFF, A.J. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. **Oral Microbiol Immunol.** 22 (3): 145–151, 2007.

KIRKWOOD, K.L.; ROSSA JUNIOR., C.; The Potential of p38 MAPK Inhibitors to Modulate Periodontal Infections. **Curr Drug Metab.** 10 (1): 55–67, 2009.

KORNMAN, K.S. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. **J Periodontol.** 79 (supl.8): 1560-1568, 2008.

KORNMAN, K.S.; BLODGETT, R.F.; BRUNSVOLD, M.; HOLT, S.C. Effects of topical applications of meclofenamic acid and ibuprofen on bone loss, subgingival microbiota and gingival PMN response in the primate *Macaca fascicularis*. **J Periodontal Res.** 25:300–307, 1990.

KRAYER, J.W.; LEITE, R.S; KIRKWOOD, K.L.; Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. **Dent Clin North Am.** 54(1):13-33, 2010.

KU, S.K.; CHO, H.R.; SUNG, Y.S.; KANG, S.J.; LEE, Y.J. Effects of calcium gluconate on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 108 (4): 241-250, 2011.

KUO, L.C.; POLSON, A.M.; KANG, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public Health.** 122(4):417-33 2008.

KUSUMOTO, Y.; HIRANO, H.; SAITOH, K.; YAMADA, S.; TAKEDACHI, M.; NOZAKI, T.; OZAWA, Y.; NAKAHIRA, Y.; SAHO, T.; OGO, H.; SHIMABUKURO, Y.; OKADA, H.; MURAKAMI, S.; Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. **J Periodontol.** 75(3):370-9, 2004.

LANE, N.; ARMITAGE, G.C.; LOOMER, P.; HSIEH, S.; MAJUMDAR, S.; WANG, H.Y.; JEFFCOAT, M.; MUNOZ, T.; Bisphosphonate Therapy Improves the Outcome of Conventional Periodontal Treatment: Results of a 12-Month, Randomized, Placebo-Controlled Study. **J Periodontol.** 76(7):1113-1122, 2005.

LANG, N.P.; SCHÄTZLE, M.A.; LÖE, H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 36 (10): 3-8, 2009.

LI, K.L.; VOGEL, R.; JEFFCOAT, M.K.; ALFANO, M.C.; SMITH, M.A.; COLLINS, J.G. The effect of ketoprofen creams on periodontal disease in rhesus monkeys. **J Periodontol Res.** 31:525-532, 1996.

LIN, W.L.; MCCULLOCH, C.A.; CHO, M.I. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anat Rec** 240:492-506, 1994.

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAITJO, M. **Anatomia do Periodonto.** Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral, Guanabara Koogan, 5ª ed., p.3, 6 e 7, 2010.

LIU, L.; LI, C.; CAI, C.; XIANG, J.; CAO, Z. Cyclophilin A (CypA) is associated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis. **Biochem Biophys Res Commun.** 391 (1): 1000-6, 2010.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochem Pharmacol.** 50(3):347-53, 1995.

LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H.; MORRISON, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol.** 13:431-45, 1986.

LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol.** 36:177-187, 1965.

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

MAHANONDA, R.; PICHYANGKUL, S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. **Periodontol** 2000. 43: 41-55, 2007.

MARCACCINI, A.M.; MESCHIARI, C.A.; ZUARDI, L.R.; DE SOUSA, T.S.; TABA, M. JR.; TEOFILO, J.M.; JACOB-FERREIRA, A.L.; TANUS-SANTOS, J.E.; NOVAES, A.B. JR.; GERLACH, R.F. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. **J Clin Periodontol**. 37 (2): 180-90, 2010.

MATTHEWS, J.B.; WRIGHT, H.J.; ROBERTS, A.; LING-MOUNTFORD, N.; COOPER, P.R.; CHAPPLE, I.L.; Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. **J Dent Res**. 86:718-722, 2007.

MEIRA, A.L.T.; TODESCAN, S.M.C.; AZOUBEL, E.; BITTENCOURT, S.; AZOUBEL, M.C.F. Uso de antimicrobianos locais em peridontia: uma abordagem crítica. **Peridontia**. 17(1):83-89, 2007.

MENEZES, R.; GARLET, T.P.; LETRA, A.; BRAMANTE, C.M.; CAMPANELLI, A.P.; FIGUEIRA, R.C.; SOGAYAR, M.C.; GRANJEIRO, J.M.; GARLET, G.P. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **J of Endodontics**. 34 (8): 932-938, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**. Brasília, 2011.

MITCHELL JA, AKARASEREENONT P, THIEMERMANN C, FLOWER RJ, VANE JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 90(24):11693-7, 1993.

MORTON, R.S.; DONGARI-BAGTZOGLU, A.I . Cyclooxygenase-2 is Upregulated in Inflamed Gingival Tissues. **J Periodontol**. 72(4):461-9, 2001.

MURAYAMA R.; KOBAYASHI, M.; TAKESHITA, A.; YASUI, T.; YAMAMOTO, M. MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B mediate production of interleukin- $1\beta$  stimulated cytokines, prostaglandin  $E_2$  and MMP-1 in human periodontal ligament cells. **J Periodont Res** 46: 568–575, 2011.

NAKASHIMA K.; ROEHRICH, N.; CIMASONI, G.; Osteocalcin, Prostaglandin  $E_2$  and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. **J Clin Periodontol**. 21:327–333, 1994.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology** 2000. 40: 11–28, 2006.

NAPIMOGA, M.H.; BENATTI, B.B.; LIMA, F.O.; ALVES, P.M.; CAMPOS, A.C.; PENA-DOS-SANTOS, D.R.; SEVERINO, F.P.; CUNHA, F.Q.; GUIMARÃES, F.S. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. **Int Immunopharmacol.** 9 (2): 216-22, 2009.

NIBALI, L.; O'DEA, M.; BOUMA, G.; PARKAR, M.; THRASHER, A.J.; BURNS, S.; DONOS, N. Genetic variants associated with neutrophil function in aggressive periodontitis and healthy controls. **J Periodontol.** 81:527-534, 2010.

NOGUCHI, K.; ISHIKAWA, I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> in periodontal disease. **Periodontology** 2000. 43: 85-101, 2007.

NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L.; How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? **J Clin Periodontol.** 38(11):49-59, 2011.

NYMAN, S.; SCHROEDER, H. E.; LINDHE, J. Suppression of Inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. **J Periodontol.** 50(9):450-461, 1979.

O'NEIL, L.A. Signal Transduction pathways activated by the IL-1 receptor / toll-like receptor superfamily. **Curr Top Microbial Immunol.** 270: 47-61, 2002.

OFFENBACHER S.; FARR D.H.; GOODSON J.M. Measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> in crevicular fluid. **J Clin Periodontol.** 8(4):359-67, 1981.

OFFENBACHER S.; ODLE, B.M.; GRAY, R.C.; VAN DYKE, T.E. Crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. **J of Periodont Res.** 19 (1): 1–13, 1984.

OFFENBACHER, S.; WILLIAMS, R.C.; JEFFCOAT, M.K.; HOWELL, T.H.; ODLE, B.M.; SMITH, M.A. Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss. **J Periodontal Res.** 27:207-13, 1992.

OHYAMA H, KATO-KOGOE N, KUHARA A, NISHIMURA F, NAKASHO K, YAMANEGI K, YAMADA N, HATA M, YAMANE J, TERADA N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. **J Dent Res.** 88 (7): 633-638, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Oral health: fact sheets.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>>. Acesso em: 01 out. 2012.

PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. **Periodontology** 2000. 14: 9-11, 1997.

PAGE, R.; SCHROEDER, H. **Periodontitis in man and other animals: a comparative review.** Basel: Karger 1982.

POLAT B, SULEYMAN H, ALP HH. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats. **Chem Biol Interact.** 186(1):82-9, 2010.

PÖLLÄNEN, M.T.; LAINE, M.A.; IHALIN, R.; UITTO, V.J.; Host-bacteria crosstalk at the dentogingival junction. **Int J Dent.** 2012: 1-14, 2012.

POULIOT, M.; CLISH, C.B.; PETASIS, N.A.; VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Lipoxin A4 Analogues Inhibit Leukocyte Recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: A Role for Cyclooxygenase-2 and Lipoxins in Periodontal Disease. **Biochemistry.** 39, 4761-4768, 2000.

PRESHAW P.M. Definitions of periodontal disease in research. **J Clin Periodontol.** 36: 1–2, 2009.

QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; MALTOS, K.L.; CALIARI, M.V.; DUARTE, I.D.; FRANCISCH, J.N. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontitis in rats. **J Periodont Res.** 44 (2): 153-160, 2009.

REDDY, M.S.; GEURS, N.C.; GUNSOLLEY, J.C. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. **Ann Periodontol.** 8(1):12-37, 2003.

REN, L.; JIANG, Z. Q.; FU, Y. *et al.* The Interplay of Lipopolysaccharide-Binding Protein and Cytokines in Periodontal Health and Disease. **J Clin Periodontol.** 36:619-626, 2009.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A.; Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 31(5): 986–1000, 2011.

RYDER, M.I.; Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. **Periodontol 2000.** 53:124-37, 2010.

SAFFAR, J.; LASFARGUE, J.; HERRUA, M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. **Periodontology 2000.** 13: 76-90, 1997.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM P.; BEHLING, U.H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodont. Res.** 17 (3): 263-274, 1982.

SALVI, G.E.; LINDHE, J.; LANG, N.P. **Exame de Pacientes com Doenças Periodontais.** Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral, Guanabara Koogan, 5ª ed., cap. 26, 2010.

SCOTT, D.A.; KRAUSS, J.; Neutrophils in periodontal inflammation. **Front Oral Biol.** 15:56-83, 2012.

SHIBATA, K.; WARBINGTON, M.L.; GORDON, B.J.; KURIHARA, H.; VAN DYKE, T.E. Defective calcium influx factor activity in neutrophils from patients with localized juvenile periodontitis. **J Periodontol.** 71(5):797-802, 2000.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNE, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C.; Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal. Biochem.** 150:76-86, 1985.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental Biofilms: Difficult Therapeutic Targets. **Periodontology 2000.** 2812–2855, 2002.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. **J Periodontology.** 63 (4): 328-331, 1992.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L.JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.** 25: 134–44, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques.** 17 (4): 788-792, 1994.

SODEK, J.; McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000.** 24: 99–126, 2000.

SOUZA, J.A.C.; ROSSA JUNIOR, C.; GARLET, G.P.; NOGUEIRA, A.V.B.; CIRELLI, J.A. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. **J Appl Oral Sci.** 20 (2): 128-38, 2012.

SOUZA, J.A.C.; NOGUEIRA, A.V.B.; DE SOUZA, P.P.; CIRELLI, J.A.; GARLET, G.P.; ROSSA JUNIOR, C. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. **Arch Oral Biol.** 56 (10): 1120-8, 2011.

STEEVE, K.T.; MARC, P.; SANDRINE, T.; DOMINIQUE, H.; YANNICK, F.; IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology **Cytokine & Growth Factor Reviews.** 15:49–60, 2004.

STRUILLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. Experimental animal models in periodontology: a review. **Open Dent J.** 29;4:37-47, 2010.

SUDA, K.; UDAGAWA, N.; SATO, N.; TAKAMI, M.; ITOH, K.; WOO, J.T.; TAKAHASHI, N.; NAGAI, K. Suppression of Osteoprotegerin expression by prostaglandin E<sub>2</sub> is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. **J Immunol.** 172: 2504-2510, 2004.

SUZUKI, T.; CHOW, C.W.; DOWNEY, G.P.; Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 40(6-7):1348-1361, 2008.

TAUBMAN, M.A.; VALVERDE, P.; HAN, X.; KAWAI, T.; Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. **J Periodontol.** 76(11):2033-41, 2005.

THOMAS, M.V.; PULEO, D.A. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. **J Dent Res.** 90(9):1052-61, 2011.

TRIBUTINO, J.L.M.; DUARTE, C.D.; CORRÊA, R.S.; DORIGUETTO, A.C.; ELLENA, J.; ROMEIRO, N.C.; CASTRO, N.G.; MIRANDA A.L.; BARREIRO E.J.; FRAGA C.A. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg Med Chem.** 17:1125-1131, 2009.

TRIBUTINO, J.L.M.; **Estudo do perfil antiinflamatório e neuroprotetor de novos análogos do composto LASSBio 294.** Tese de doutorado. Departamento de Farmacologia Básica e Clínica. Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, 2008.

TSAI C.C.; HONG Y.C.; CHEN C.C.; WU Y.M. Measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> in the gingival crevicular fluid. **J Dent.** 26:97–103, 1998.

TSUBOI, M.; KAWAKAMI, A.; NAKASHIMA, T.; MATSUOKA, N.; URAYAMA, S.; KAWABE, Y.; FUJIYAMA, K.; KIRIYAMA, T.; AOYAGI, T.; MAEDA, K.; EGUCHI, K. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. **J Lab Clin Med** 134:222-231, 1999.

UITTO, V.J.; OVERALL, C.M.; MCCULLOCH, C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. **Periodontology** 2000. 31:77-104, 2003.

VAN DYKE, T.E.; Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. **J Clin Periodontol.** 38(11):119–125, 2011.

VANE, J.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M.; Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 38: 97-120, 1998.

WADA, N.; MENICANIN, D.; SHI, S.; BARTOLD, P.M.; GRONTHOS, S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. **J Cell Physiol.** 219 (3): 667-676, 2009.

WAITE, I.M.; SAXTON, C. A.; YOUNG, A.; WAGG, B.J.; CORBETT, M. The periodontal status of subjects receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Periodontol Res.** 16: 100-108, 1981.

WEINBERG, A.; KRISANAPRAKORNKIT, S.; DALE, B.A.; Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. **Crit Rev Oral Biol Med.** 9(4):399-414, 1998.

WILLIAMS, R.C. Understanding and managing periodontal diseases: a notable past, a promising future. **J Periodontol.** 79(8):1552-9, 2008.

WILLIAMS, R.C.; JEFFCOAT, M.K.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S.; JOHNSON, H.G.; HALL, C.M. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. **J Periodontol Res.** 23:225-29, 1988.



WILLIAMS, R.C.; JEFFCOAT, M.K.; HOWELL, T.H.; ROLLA, A.; STUBBS, D.; TEOH, K.W. Altering the progression of human alveolar bone loss with the nonsteroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. **J Periodontol.** 60(9):485-490, 1989.

WEI S, KITaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. **J Clin Invest** 115:282-290, 2005.

WILLIAMS, R.C.; JEFFCOAT, M.K.; KAPLAN, M.L.; GOLDBERGER, P.; JOHNSON, H.G.; WECHTER, W.J. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. **Science.** 227(4687):640-2, 1985.

YAMAMOTO, T.; LI, M.; LIU, Z.; GUO, Y.; HASEGAWA, T.; MASUKI, H.; SUZUKI, R.; AMIZUKA, N. Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. **Odontology.** 98:102–109, 2010.

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

YIPP, B.G.; PETRI, B.; SALINA, D.; JENNE, C.N.; SCOTT, B.N.; ZBYTNUIK, L.D.; PITTMAN, K.; ASADUZZAMAN, M. WU, K.; MEIJNDERT, H.C.; MALAWISTA, S.E.; DE BOISFLEURY CHEVANCE A, ZHANG K, CONLY J, KUBES P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nat Med.** 18: 1386–1393, 2012.

YUCEL-LINBERG, T.; NILSON, S.; MODEER, T. Signal Transduction Pathways Involved in the Synergistic Stimulation of Prostaglandin Production by Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Human Gingival Fibroblasts. **J Dent Res.** 78: 61-68, 1999.