



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

**Estudo do efeito terapêutico de formulação em gel orabase
contendo polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium
occidentale* Linn.) em ratos com periodontite induzida por
ligadura**

HYGOR FERREIRA FERNANDES

PARNAÍBA – PI
2018

HYGOR FERREIRA FERNANDES

Estudo do efeito terapêutico de formulação em gel orabase contendo polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) em ratos com periodontite induzida por ligadura

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO (ponto focal: Universidade Federal do Piauí), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área concentração: Biotecnologia em Saúde
Orientador: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

PARNAÍBA – PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

F363e Fernandes, Hygor Ferreira.
Estudo do efeito terapêutico de formulação em gel orabase contendo polissacarídeo da goma de cajueiro (*Anacardium Occidentale* Linn.) em ratos com periodontite induzida por ligadura / Hygor Ferreira Fernandes. -- 2018.
112 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia RENORBIU, Teresina, 2018.

“Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto”

1. Periodonto – Inflamação. 2. Reabsorção óssea.
3. Polímero natural. I. Título.




CDD: 617.632

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Hygor Ferreira Fernandes

TÍTULO DO PROJETO: “ESTUDO DO EFEITO TERAPÊUTICO DE FORMULAÇÃO EM GEL ORABASE CONTENDO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* Linn.) EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto - UFPI (Presidente)	<u>Aprovado</u>	<u></u>
Profª. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovado</u>	<u></u>
Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira - UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	<u></u>
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus – IESVAP (Examinadora)	<u>Aprovado</u>	<u></u>
Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho - UFPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 18 de dezembro de 2018.

HORÁRIO: 08h30

LOCAL: Auditório do Oeste do setor II/ Bloco 03 da Universidade Federal do Piauí,
Parnaíba/PI

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a todos os pesquisadores que contribuíram com seu tempo e expertise técnica para a condução dos procedimentos experimentais deste trabalho. À professora Durcilene Alves da Silva, em nome da qual agradeço à toda a equipe de alunos do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), que ajudou a coletar e purificar a goma do cajueiro. Aos professores Daniel Fernando Vasconcelos e Jand Venes Medeiros, em nome dos quais agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Análise e Preparação Histológica (LAPHIS) e do Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFEX), respectivamente, que participaram ativamente dos experimentos com os animais. Ao professor e colega de doutorado Manoel Dias Filho, pelo esforço empreendido para integrar diferentes laboratórios do campus em um único projeto, pelos dias e noites em laboratório, e por me apontar uma luz no fim do túnel.

Agradeço o apoio da Universidade Federal do Piauí, campus Ministro Reis Velloso, pelo espaço e infra-estrutura cedidos para a realização deste trabalho. Agradeço especialmente a todos os vigilantes e zeladores desta instituição, pela manutenção da ordem e segurança, essenciais para que a pesquisa em laboratório ocorresse de maneira harmoniosa. Não poderia deixar de agradecer o suporte financeiro da Prefeitura Municipal de Parnaíba (por intermédio do edital Mac-Doubles Fernandes do Nascimento de Apoio à Ciência, Tecnologia e Inovação); da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI); assim como o apoio do professor Rommel Rodriguez Burbano, em nome do qual agradeço a toda a equipe de pesquisadores do Pará, que mantém parceria de longa data com nosso grupo.

Meus agradecimentos se destinam também a todos aqueles que contribuíram para incrementar qualidade à parte escrita desta tese, em especial ao meu orientador, professor Giovanni Rebouças Pinto, que influencia minha forma de escrever desde minha primeira iniciação científica em 2010. Obrigado pelas críticas (sempre construtivas), pela paciência e disponibilidade em ler e reler os textos, pelas sugestões (e não imposições) e também pelos elogios, que

fazem um bem danado para a autoestima e saúde mental, tão importantes na fase de gestação da tese. Meus sinceros agradecimentos aos professores que compuseram minha banca de qualificação e de defesa (Durcilene Alves da Silva, Jefferson Soares de Oliveira, Joilson Ramos de Jesus e José Delano Barreto Marinho Filho) pelas correções, sugestões e discussões que proporcionaram *insights* valiosos.

Por fim, quero agradecer todo o suporte psicológico e emocional dado por amigos e família. Mais uma vez, a meu orientador, por sempre transmitir um ar de tranquilidade em momentos que eu julgava como ameaçadores. À minha parceira mais íntima, Acaahi, por ouvir minhas lamentações, frustrações, paranoias, e tudo mais o quanto eu podia puxar das profundezas da minha mente. Obrigado pela paciência, preocupação e compreensão. Seu apoio foi fundamental para todo o processo de gestação e parto desta tese. À minha família, especialmente meu pai, Humberto, que sempre guiou minhas decisões (mesmo que ele não saiba disso), sempre no sentido de deixa-lo orgulhoso de sua cria, em quem ele investiu tanto esforço para dar educação de boa qualidade. À minha mãe, Áurea Betânia, que nos momentos de incompreensão do por quê se desgastar tanto com uma pós-graduação, indiretamente me fazia refletir sobre o por quê de se desgastar tanto com uma pós-graduação, e assim pisar um pouco mais no freio. Aos meus irmãos, Hianny e Yuri, é à minha sobrinha Heloísa, por tornarem os dias menos maçantes e mais vivos. A todos os amigos do Grupo de Pesquisa em Genética Humana e Médica (GeHMed) pela consideração e estima. Aos colegas de trabalho da Coordenação de Laboratórios, pela parceria e compreensão pelos momentos em que tive que me ausentar. Enfim, a todos que de alguma forma desejaram o meu bem, mesmo que apenas em pensamento.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica altamente prevalente no mundo. Sua causa está relacionada à reação imuno-inflamatória do hospedeiro contra biofilmes microbianos subgingivais, que resulta em destruição periodontal, eventualmente levando à perda do dente. Este estudo teve como objetivo explorar o efeito da administração tópica de formulações em gel orabase contendo goma do cajueiro (GC), um polissacarídeo complexo oriundo de *Anacardium occidentale* L., quanto à aspectos clínicos e moleculares relacionados à periodontite, como perda óssea alveolar e a expressão transcricional de genes relacionados às respostas imuno-inflamatórias e à homeostase tecidual. Fêmeas de ratos *Wistar* foram submetidas à inserção de uma ligadura de *nylon* ao redor dos primeiros molares inferiores para indução de periodontite. Grupos de 7 animais foram aleatoriamente escolhidos para receberem aplicações tópicas diárias dos seguintes tratamentos: salina 0,9% (grupo salina), gel veículo (grupo veículo), gel orabase contendo 5% da GC (grupo GC_{5%}), gel orabase contendo 15% da GC (grupo GC_{15%}) e clorexidina gel 2% (grupo CHX_{2%}). Um grupo de animais sem periodontite induzida por ligadura foi incluído como controle (grupo saudável). Após 20 dias de tratamento, os ratos foram eutanasiados. Amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e para contagem total de glóbulos brancos. As mandíbulas foram removidas e processadas para análise da perda óssea alveolar. Os tecidos gengivais ao redor da ligadura foram avaliados quanto à infiltração de neutrófilos pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO), e quanto à expressão de genes envolvidos na patogênese da periodontite por qRT-PCR (*TaqMan Gene Expression Assays*). De acordo com a análise dos níveis de MPO e da contagem total de glóbulos brancos, os grupos GC_{5%}, GC_{15%} e CHX_{2%} apresentaram inflamação local e sistêmica significativamente reduzidas, comparado aos grupos salina e veículo. Porém, somente nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} a perda óssea alveolar foi prevenida de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A aplicação tópica da formulação contendo 15% da GC e clorexidina gel 2% foram eficazes em inibir significativamente a expressão do mRNA de genes inflamatórios (*IL-1 β* , *RANKL*, *COX-2*, *NOS-2*, *INF- γ* , *TGF β 1* e *OSCAR*) e de genes relacionados à degradação da matriz extracelular (*MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-14*, *TIMP-1* e *TIMP-2*). Por outro lado, não exerceram influência sobre os níveis do mRNA de *RANK*, *OPG*, *IL-4*, *IL-10* e *MYD88*. Para todos os parâmetros analisados, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos salina e veículo, bem como entre os grupos GC_{15%} e CHX_{2%}. Em conclusão, a GC se mostrou eficaz em amenizar o quadro geral da inflamação no periodonto e suas consequências destrutivas sobre o osso alveolar, abrindo perspectivas para o uso de formulações tópicas contendo GC para prevenção ou tratamento adjuvante da periodontite.

Palavras-chave: Periodonto, Inflamação, Polímero natural, Expressão gênica, Reabsorção óssea, Tratamento.

ABSTRACT

Periodontitis is a highly prevalent chronic inflammatory disease worldwide. It is mainly promoted by the immune-inflammatory responses of the host against microbial biofilms that accumulate on dental surfaces, which in turn results in the destruction of periodontal tissues, eventually leading to tooth loss. This study aimed to explore the effect of topically administering an orabase gel containing cashew gum (CG), a complex polysaccharide from *Anacardium occidentale* L., on clinical and molecular aspects related to periodontitis such as alveolar bone loss and the transcriptional expression of genes related to immune-inflammatory responses and tissue homeostasis. Female Wistar rats were subjected to the insertion of a nylon ligature around the lower first molar to induce periodontitis. After ligature placement, animals were randomly divided into groups of 7 to receive daily topical applications of the following treatments: saline 0.9% (saline group), vehicle gel (vehicle group), orabase gel containing CG at 5% (GC_{5%} group), orabase gel containing CG at 15% (GC_{15%} group), and 2% gel chlorhexidine (CHX_{2%} group). A group without ligature-induced periodontitis was included as control (healthy group). Rats were euthanized after 20 days of treatment. Blood samples were collected for biochemical analysis and total white blood cell (WBC) count. The jaws were removed and processed for alveolar bone loss analysis. The gingival tissues around the ligature were evaluated for neutrophil influx by myeloperoxidase activity assay (MPO) and gene expression by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR; TaqMan Gene Expression Assay). According to MPO levels and WBC count, GC_{5%}, GC_{15%}, and CHX_{2%} groups showed significantly reduced local and systemic inflammation compared to saline and vehicle groups; however, alveolar bone loss was prevented in a statistically significant way ($p < 0.05$) only in GC_{15%} and CHX_{2%} groups. Topical application of the gel formulation containing GC at 15% or chlorhexidine gel 2% significantly inhibited mRNA expression of inflammatory genes (*IL-1 β* , *RANKL*, *COX-2*, *NOS-2*, *INF- γ* , *TGF β 1* e *OSCAR*) and genes related to extracellular matrix degradation (*MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-14*, *TIMP-1* e *TIMP-2*). On the other hand, there was no influence on *RANK*, *OPG*, *IL-4*, *IL-10* and *MYD88* mRNA levels. In all the analyzed parameters, there were no statistically significant differences between the saline and vehicle groups, as well as between the GC_{15%} and CHX_{2%} groups. In conclusion, GC was effective in reducing the overall inflammation in the periodontium and its destructive consequences on the alveolar bone, opening perspectives for the use of GC-containing topical formulations for the prevention or adjuvant treatment of periodontitis.

Key words: Periodontium, Inflammation, Natural polymer, Gene expression, Bone resorption, Treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO PERIODONTO	18
2.2 DOENÇAS PERIODONTAIS	22
2.3 PERIODONTITE	26
2.3.1 Aspectos patobiológicos gerais	26
2.3.2 Fator etiológico primário	28
2.3.3 Imunopatogênese: aspectos gerais	31
2.3.4 Imunopatogênese: aspectos moleculares	35
2.3.5 Aspectos epidemiológicos	38
2.3.6 Aspectos terapêuticos	40
2.3.7 Modelos experimentais	46
2.4 PRODUTOS NATURAIS E PERIODONTITE	48
2.4.1 <i>Anacardium occidentale</i> Linn	50
2.4.2 Goma do cajueiro	52
3 OBJETIVOS	58
3.1 GERAL	58
3.2 ESPECÍFICOS	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO	59
4.2 FORMULAÇÕES EM GEL ORABASE CONTENDO GC	59
4.3 INDUÇÃO DE PERIODONTITE E GRUPOS EXPERIMENTAIS	60
4.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SISTÊMICOS	62
4.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PERIODONTAIS	63
4.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MOLECULARES	64
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5 RESULTADOS	68
6 DISCUSSÃO	79
6.1 CARACTERÍSTICAS DA GC	79
6.2 TOXICIDADE	80

6.3 INFILTRADO INFLAMATÓRIO	81
6.4 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	83
6.5 GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO	85
6.6 GENES RELACIONADOS À MATRIZ EXTRACELULAR	91
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE.....	111

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Arquitetura anatômica e tecidual do periodonto	18
Figura 2 – Aspectos clínico-patológicos das doenças periodontais.....	24
Figura 3 – Fatores envolvidos na patogênese da periodontite	28
Figura 4 – Fotomicrografia eletrônica de biofilmes dentais.....	30
Figura 5 – Barreira de neutrófilos contra o avanço do biofilme subgengival ...	33
Figura 6 - Sistema RANK/RANKL/OPG na patogênese da periodontite	37
Figura 7 - Resumo esquemático da patogênese da periodontite	38
Figura 8 – Estrutura molecular da clorexidina	44
Figura 9 - Cajueiro comum (<i>Anacardium occidentale</i> Linn).....	50
Figura 10 – Goma do cajueiro	52
Figura 11 - Estrutura molecular de um fragmento da goma do cajueiro	54
Figura 12 - Preparo das formulações em gel contendo GC	60
Figura 13 - Desenho experimental	61
Figura 14 –Variação de massa corporal.....	68
Figura 15 – Parâmetros bioquímicos sistêmicos	69
Figura 16 – Parâmetros sistêmicos e locais da inflamação.....	70
Figura 17 – Perda óssea alveolar.....	71
Figura 18 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores osteoclastogênicos...	72
Figura 19 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores pró-inflamatórios.....	74
Figura 20 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores anti-inflamatórios	75
Figura 21 – Expressão de genes (mRNA) das metaloproteinases de matriz ..	77
Figura 22 - Expressão de genes (mRNA) de inibidores de MMPs	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para a determinação da severidade da periodontite	25
Tabela 2 – Achados característicos de periodontite crônica e periodontite agressiva	26
Tabela 3 – Alvos moleculares quantificados neste estudo por qRT-PCR	66
Tabela 4 - Massa relativa dos órgãos	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHX_{2%}	Grupo tratado com clorexidina gel 2%
COX-2	Ciclooxigenase-2
GAPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
GC	Goma do cajueiro
GC_{5%}	Grupo tratado com gel orabase contendo 5% de GC
GC_{15%}	Grupo tratado com gel orabase contendo 15% de GC
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MYD88	Fator de resposta primária de diferenciação mieloide 88
NO	Óxido nítrico
NOS-2	Óxido nítrico sintetase 2
OPG	Osteoprotegerina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE2	Prostaglandina E2
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
TGFβ1	Fator de transformação do crescimento beta
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TH1	linfócitos T <i>helper</i> subtipo 1
TH2	linfócitos T <i>helper</i> subtipo 2
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 1
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 2
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição irreversível dos tecidos que compõem o periodonto, aparato de sustentação dos dentes (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Na ausência de tratamento apropriado, e geralmente potencializada por diferentes fatores de risco, a periodontite pode comprometer completamente a integridade das estruturas de suporte dentário (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), eventualmente levando à perda do dente. Além das consequências físicas, estéticas e psicossociais, o processo inflamatório crônico instalado no periodonto eleva significativamente o risco de desenvolvimento de patologias sistêmicas, especialmente doenças cardiovasculares (BEUKERS et al., 2017; PAPAPANOU; SUSIN, 2017).

Embora amplamente desconhecida pela comunidade leiga, quando comparada à outras condições patológicas da cavidade oral (como as cáries, por exemplo), a periodontite é uma doença altamente prevalente no mundo inteiro, o que a torna um sério desafio no âmbito da saúde pública (KASSEBAUM et al., 2017). A forma mais severa da doença acomete cerca de 11% da população mundial e esta estimativa sobe para 20% em países da América Latina (PAPAPANOU; SUSIN, 2017). Diante disso, a comunidade acadêmica tem demonstrado contínuo interesse em elucidar os mecanismos patobiológicos da periodontite, na busca por biomarcadores importantes da doença, capazes de inspirar novas alternativas de tratamento (Para revisão, HAJISHENGALLIS et al., 2017).

De acordo com o acúmulo de evidências científicas nos últimos anos, a periodontite pode ser considerada uma doença multifatorial; no entanto, apresenta um fator etiológico primário: a formação de comunidades polimicrobianas ultraorganizadas sobre a superfície dos dentes (biofilme dental), que porventura adentram as áreas subgingivais (HARVEY, 2017). A presença de bactérias patogênicas no ambiente subgingival ativa as repostas inatas e adaptativas do sistema imune do hospedeiro, as quais incluem a mobilização de um exército de células de defesa para o sítio de infecção, mediada pela ação

coordenada de uma grande variedade de citocinas inflamatórias (SILVA et al., 2015a).

Nesta guerra imunológica contra a ameaça microbiana ao periodonto, inicialmente travada no ambiente inflamado da gengiva, os neutrófilos compõem a linha de frente de defesa do hospedeiro, combatendo a infecção por meio de fagocitose e pela liberação do conteúdo tóxico dos seus grânulos (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016). No entanto, para aumentar a mobilidade destas e de outras células de defesa nos tecidos fibrosos do periodonto, a secreção de enzimas degradadoras de matriz extracelular, coletivamente conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs), encontra-se fisiologicamente aumentada. Com a persistência da infecção, a ação crônica destas enzimas promove a gradual destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal, responsáveis pela ancoragem da raiz do dente ao cemento e ao osso alveolar (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

Outra consequência do cenário inflamatório induzido pela infecção periodontal se reflete no metabolismo ósseo. Potentes mediadores inflamatórios secretados, sobretudo, por macrófagos e linfócitos T, sendo a interleucina 1 beta (IL-1 β) seu principal representante, induzem a síntese do ligante do receptor ativador kappa-B (RANKL), principal estímulo molecular para gênese de osteoclastos. Estas células multinucleadas passam a secretar enzimas proteolíticas especializadas na degradação de matriz óssea, colateralmente atuando sobre o tecido alveolar ao redor do dente (CEKICI et al., 2014). Assim, a inserção do dente no seu alvéolo, já fragilizada pela destruição do ligamento periodontal e cemento, torna-se inviável com a deterioração do suporte ósseo circundante, resultando em perda dentária.

Uma vez reconhecida a natureza primordialmente infecciosa da periodontite, a remoção do biofilme patogênico parece ser a solução terapêutica mais óbvia. No entanto, em grande parte dos casos, a doença evolui de forma silenciosa, ou seja, sinais e sintomas se tornam evidentes somente em estágios avançados da doença (PAPAPANOU; SUSIN, 2017). Portanto, a prevenção deve ser a medida a considerada antes de tudo, o que inclui boa higiene oral, eliminação de fatores de risco modificáveis (tabagismo e má higiene bucal, por exemplo) e profilaxia profissional periódica (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Neste contexto, diversos estudos têm buscado

desenvolver métodos de prevenção farmacológica para a periodontite, com a utilização de agentes capazes de prevenir a formação do biofilme dental sem afetar o equilíbrio biológico da cavidade oral, ou de modular a expressão de genes associados à destruição inflamatória do periodonto (FURLANETO et al., 2018; KHARAEVA et al., 2016; RENN et al., 2018; SUN et al., 2016).

Quando diagnosticada, a periodontite é principalmente tratada por intervenções mecânicas não cirúrgicas para remoção do biofilme patogênico, e cirúrgicas, quando a infecção persiste pela presença de bactérias nos tecidos profundos do periodonto. Em ambos os casos, agentes antimicrobianos são também utilizados como parte da terapia (SMILEY et al., 2015). Entre os mais comuns, destacam-se os antibióticos de amplo espectro, tais como amoxicilina e doxiciclina, e agentes antissépticos, principalmente representados pela clorexidina (HARVEY, 2017). Embora de crucial importância para a eliminação dos resquícios bacterianos após o tratamento mecânico primário, prevenindo assim a recorrência da doença, a farmacoterapia adjuvante nem sempre demonstra benefícios claros, e geralmente envolve o risco de efeitos adversos e resistência bacteriana (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Por conseguinte, novas estratégias são urgentemente necessárias para resolver tal problema.

Nos últimos anos, uma maior atenção tem sido dada ao potencial terapêutico de produtos naturais na promoção da saúde periodontal (CHAVA; VEDULA, 2013; JUIZ; ALVES; BARROS, 2010; NAGATA et al., 2008; NASRA et al., 2017). O reino vegetal é considerado a principal fonte de compostos bioativos com potencialidades farmacêuticas. No Brasil, país de rica biodiversidade vegetal, a *Anacardium occidentale* Linn., árvore popularmente conhecida como cajueiro (família: *Anacardiaceae*), é uma planta de grande valor econômico e medicinal, sendo encontrada quase que endemicamente na região Nordeste do país (DA SILVA; RODRIGUES, 2014).

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo que compõe o exsudato produzido naturalmente por *A. occidentale* em resposta a injúrias mecânicas ou ao ataque de patógenos, e pode ser obtida a partir do caule após a poda da árvore. A exemplo de outros polissacarídeos naturais, a goma do cajueiro é um excelente insumo para diversos produtos e apresenta vantagens relacionadas à capacidade natural em formar géis, facilidade de interagir com

espécies dissolvidas e moléculas de origem biológica (FURTADO et al., 2013). É principalmente explorada para aplicações industriais, especialmente na área alimentícia e de cosméticos; no entanto, seu potencial farmacológico e biotecnológico vem sendo destacado nos últimos anos, principalmente como agente antidiarreico, gastroprotetor, antiinflamatório e antimicrobiano (ARAÚJO et al., 2015; CAMPOS et al., 2012; CARVALHO et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2017; YAMASSAKI et al., 2015).

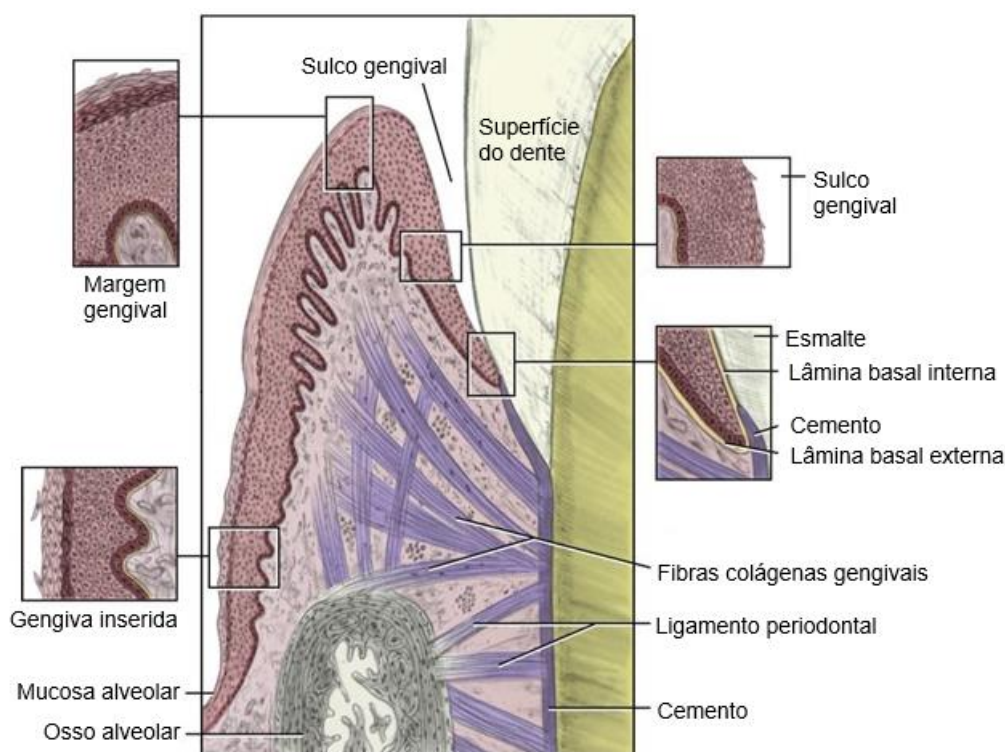
Diante do exposto, o presente trabalho visou desenvolver uma formulação em gel orabase contendo goma do cajueiro e avaliar seu efeito na prevenção da perda óssea alveolar causada pela periodontite experimental em ratos, assim como na expressão de genes intimamente relacionados à doença periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO PERIODONTO

Periodonto é o termo utilizado em odontologia para descrever o conjunto de tecidos e estruturas da cavidade oral responsáveis pela inserção e sustentação dos dentes nos ossos maxilares. É constituído por: osso alveolar, cimento, ligamento periodontal e gengiva (Figura 1) (HASSELL, 1993). Embora apresentem localização, arquitetura tecidual e composição bioquímica e celular relativamente distintas, estes tecidos atuam coletivamente como uma unidade, cujo propósito principal é manter os dentes em posição fixa, mesmo sob influência de forças mecânicas, tais como as exercidas durante a mastigação (NANCI; BOSSHARDT, 2006). Para a manutenção de sua integridade, o periodonto é também especialmente adaptado à microbiota bucal, contando com barreiras físicas de proteção e com uma vasta rede vascular e linfática que garante o imediato acesso dos componentes do sistema imune aos tecidos periodontais (EBERSOLE et al., 2017).

Figura 1 – Arquitetura anatômica e tecidual do periodonto



Fonte: pocketdentistry.com [Acesso em 25 de abril de 2018]

A gengiva, em condições saudáveis, é o único componente periodontal visível ao exame clínico (HASSELL, 1993). É o tegumento que reveste toda a extensão do periodonto e fornece proteção às demais estruturas. Compreende um típico epitélio escamoso estratificado, majoritariamente queratinizado, e um tecido conjuntivo subjacente. Curiosamente, o epitélio que reveste o sulco gengival (canal raso entre a margem da gengiva e a superfície do dente) é desprovido de camada protetora de queratina, o que torna esta região o epicentro das reações inflamatórias que posteriormente podem dar origem às doenças periodontais (GROEGER; MEYLE, 2015). Na base do sulco gengival, células epiteliais especializadas aderem organicamente aos tecidos calcificados do dente (epitélio juncional), selando assim o acesso de microrganismos da cavidade oral aos tecidos mais profundos do periodonto (POLLANEN; SALONEN; UITTO, 2003).

A inserção da gengiva aos arredores dos demais tecidos periodontais é mantida graças a uma intrincada rede de fibras densas de colágeno que compõe cerca de 60-65% do tecido conjuntivo gengival. Este tecido, também conhecido como lâmina própria, também abriga toda a arquitetura nervosa, vascular e linfática da gengiva, assim como uma variedade de células, embebidas em uma matriz extracelular rica em glicoproteínas e proteoglicanos (GROEGER; MEYLE, 2015; HASSELL, 1993). Todo o colágeno e a maioria dos demais componentes da matriz extracelular é sintetizada por fibroblastos, o que explica a extrema abundância destas células na lâmina própria gengival. Por outro lado, os fibroblastos gengivais também secretam enzimas degradadoras de matriz, como collagenases e MMPs, o que confere a eles papel central na manutenção da integridade e homeostase tecidual (CHIQUEL; KATSAROS; KLETSAS, 2015).

Entre as células presentes na lâmina própria da gengiva encontram-se também células do sistema imunológico, como mastócitos e macrófagos teciduais, que, juntamente com as células dendríticas do epitélio gengival, são responsáveis por iniciar e manter uma resposta de defesa contra substâncias e células estranhas ao tecido (HASSELL, 1993). Além disso, diferentes tipos de leucócitos que transitam no lúmen da vasculatura gengival também podem ser eventualmente observados no ambiente colagenoso da lâmina própria da gengiva saudável. Estas células, especialmente os neutrófilos, imigram em massa para os tecidos gengivais atraídos por substâncias quimiotáticas

liberadas localmente em resposta à presença de microrganismos patogênicos (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016).

Além da lâmina própria gengival, o periodonto conta com um segundo tecido conjuntivo fibroso, conhecido como ligamento periodontal, que preenche integralmente o estreito espaço entre a raiz do dente e o osso alveolar no qual está alojado. Como qualquer outro tecido conjuntivo, o ligamento periodontal é formado por células em uma matriz extracelular constituída por colágeno e outros constituintes não colagenosos. É caracterizado por um arranjo complexo de feixes densos de colágeno que se ancoram ao cemento radicular de um lado, espalham-se no espaço do ligamento periodontal em vários planos e se inserem dentro da placa cribiforme dos alvéolos dentários do outro lado. No interstício, encontram-se células, fibras secundárias, vasos sanguíneos, canais linfáticos e elementos nervosos (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

Além de proporcionar uma ancoragem robusta do dente no seu alvéolo e fornecer suprimento vascular e nutritivo para os tecidos periodontais adjacentes, o ligamento periodontal desempenha outras funções importantes para a manutenção da unidade periodontal. Ele funciona como um amortecedor natural, absorvendo e dissipando os choques mecânicos associados à mastigação ou a outros contatos dentários. Além disso, as fibras do ligamento periodontal formam um segundo nível de contenção física, agindo em conjunto com a gengiva como barreira protetora contra a microbiota patogênica da cavidade oral (DE JONG et al., 2017). Não menos importante, células residentes no ligamento periodontal são importante reguladores da síntese e reabsorção dos componentes extracelulares dos tecidos periodontais, garantindo assim a constante renovação das fibras de colágeno do ligamento periodontal (fibroblastos), deposição de novo cemento sobre a raiz do dente (cementoblastos) e produção de matéria prima para neoformação óssea (osteoblastos) (JIANG et al., 2016; NANCI; BOSSHARDT, 2006).

O cemento está interposto entre a raiz do dente e o ligamento periodontal. É uma fina camada de tecido mineralizado que cobre toda extensão da superfície da raiz, e se assemelha ao tecido ósseo em muitos aspectos, com algumas diferenças marcantes, entre elas a ausência de vasos sanguíneos e capacidade reduzida de remodelamento. A matriz orgânica do cemento é composta predominantemente por fibrilas de colágeno entrecruzadas, sobre as quais se

depositam cristais de hidroxiapatita (YAMAMOTO et al., 2016). Com base na presença ou ausência de cementócitos em sua estrutura, o cimento pode ser classificado em dois tipos, que se distinguem em localização e função. O tipo acelular reveste a superfície cervical da raiz e fornece o ponto de ancoragem para as principais fibras do ligamento periodontal, sendo, portanto, crucial para a fixação do dente na arcada alveolar. Já o cimento celular cobre a porção apical, e acredita-se que desempenhe um papel adaptativo, mantendo o dente em sua posição oclusal (FOSTER, 2017).

Em odontologia, alvéolo é o nome dado à cavidade do processo alveolar (extensão do corpo da mandíbula e maxila) onde a raiz do dente está alojada (HASSELL, 1993). O osso alveolar, tecido ósseo que envolve os alvéolos, fornece outro ponto de ancoragem às fibras do ligamento periodontal, completando assim a função primária do periodonto: fixação e sustentação do dente. Embora maior parte do osso alveolar tenha aspecto trabecular (osso esponjoso), suas porções externas são constituídas de osso compacto. A placa de osso compacto adjacente ao ligamento periodontal contém perfurações por meio das quais vasos sanguíneos e fibras nervosas são compartilhadas entre o ligamento periodontal e o espaço medular do osso alveolar (JIANG et al., 2016; SAFFAR; LASFARGUES; CHERRUAU, 1997). As fibras do ligamento periodontal, por outro lado, estão embebidas na superfície do osso compacto, dentro do qual se tornam parcialmente calcificadas, passando a receber o nome de fibras de Sharpey (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

O osso alveolar, como qualquer tecido ósseo, é constituído por uma matriz orgânica majoritariamente colagenosa intimamente associada a uma matriz inorgânica composta basicamente por íons de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita. A matriz óssea é essencialmente povoada por osteócitos (osteoblastos enclausurados na matriz mineralizada) (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Devido às forças mecânicas as quais está continuamente submetido, o osso alveolar está em constante remodelamento. Este processo envolve o recrutamento de células progenitoras de osteoclastos, que se diferenciam sob o comando de estímulos moleculares específicos e, ao se fundirem umas às outras, tornam-se osteoclastos maduros, capazes de aderir ao osso e secretar substâncias ácidas e enzimas líticas que destroem as estruturas proteicas e mineralizadas do osso. Em contrapartida, os osteoblastos,

secretam os componentes de matriz necessários para aposição de novo osso (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

Fisiologicamente, os processos de reabsorção óssea osteoclástica e de formação óssea osteoblástica estão em perfeito equilíbrio, regulados por uma complexa rede de sinalização molecular, incluindo fatores locais e sistêmicos (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). Obviamente, qualquer evento que perturbe este equilíbrio tem consequências qualitativas e quantitativas sobre o tecido ósseo, muitas vezes de caráter patológico (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Osteócitos também exercem papel importante no remodelamento ósseo, funcionando como mecanorreceptores e orquestradores desse processo (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). No caso particular do osso alveolar, quando um ou mais dentes são perdidos, a falta de estímulos mecânicos desencadeia sua completa reabsorção, demonstrando assim a interdependência entre os tecidos periodontais e o dente (NANCI; BOSSHARDT, 2006). Assim, a preservação dos processos alveolares torna-se uma estratégia fundamental na periodontia preventiva.

2.2 DOENÇAS PERIODONTAIS

Qualquer condição patológica, herdada ou adquirida, que envolva os tecidos de revestimento e suporte do periodonto pode ser referida como doença periodontal. Os termos gengivite e periodontite, por sua vez, são usados para descrever os dois fenótipos clínicos mais comuns. Ambos compartilham o biofilme dental como gatilho etiológico e a inflamação como principal característica (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Quando a doença atinge o periodonto ao redor de implantes dentários, os termos gengivite e periodontite são, por convenção, substituídos por mucosite peri-implantar e peri-implantite, respectivamente (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

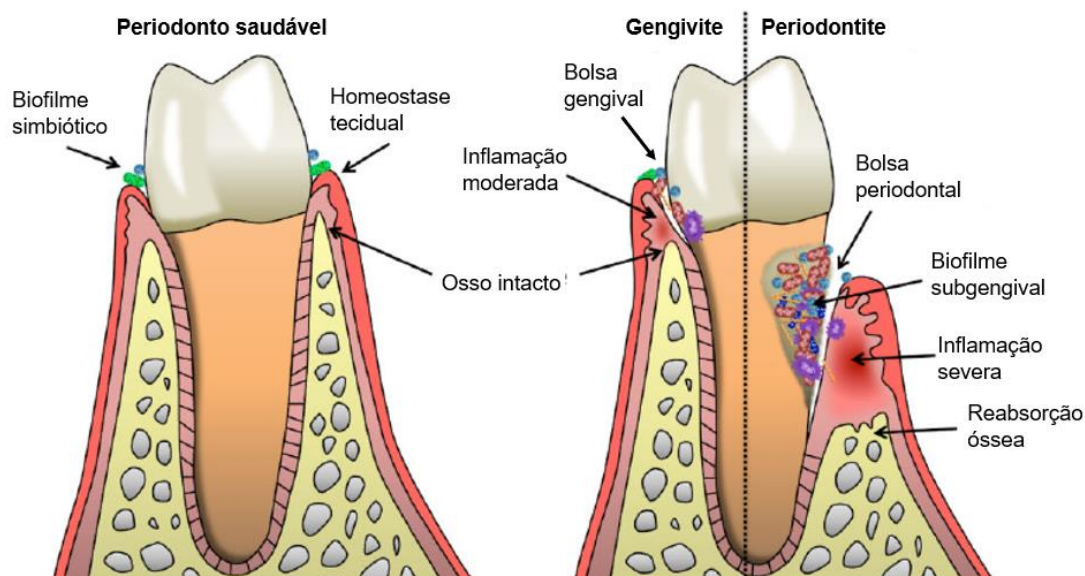
A gengivite corresponde ao estágio mais básico de doença periodontal, sendo geralmente iniciada em um contexto de higiene oral deficiente, propício à formação de biofilmes multibacterianos sobre a superfície do dente. Na região supragengival, o biofilme dental é o principal responsável pelo aparecimento de cáries (HARVEY, 2017). Quando adentra o ambiente subgengival, os

componentes bacterianos do biofilme se defrontam com mecanismos de defesa inatos do sistema imune hospedeiro, gerando os sinais inflamatórios clássicos de gengivite, como inchaço e vermelhidão locais, associados a eventuais sangramentos (SILVA et al., 2015a).

Geralmente, as respostas imediatas do sistema imunológico são eficientes em controlar o constante desafio microbiológico no sulco gengival. No entanto, vários fatores podem desequilibrar este delicado sistema de defesa. Um deles é a destruição da integridade estrutural e funcional do epitélio que une gengiva e dente (epitélio juncional), que acontece não apenas em detrimento da ação direta de fatores de virulência específicos do biofilme, mas também como consequência indireta da própria resposta inflamatória. Assim, com a degeneração das junções intercelulares e o gradual descolamento do epitélio juncional da superfície do dente, ocorre uma ampliação das dimensões do sulco gengival (vertical e horizontalmente), o que permite um maior acúmulo de biofilme nos tecidos periodontais (BOSSHARDT, 2018).

Em condições normais, a profundidade do sulco gengival varia de 1 mm a 3 mm. Profundidades iguais ou superiores a 4 mm estão significativamente relacionadas a lesões inflamatórias no periodonto. Nestas condições, o sulco gengival pode ser convenientemente referido como bolsa gengival (quando os danos estão restritos à gengiva) ou bolsa periodontal (quando os danos também comprometem o cemento, ligamento periodontal e osso alveolar) (Figura 2) (HARVEY, 2017). A formação destas “bolsas” é acompanhada pelo aumento, em volume, do fluido crevicular gengival. Este fluido nada mais é do que soro sanguíneo que transborda osmoticamente dos capilares locais para o fundo do sulco gengival. Em condições saudáveis, embora seja encontrado em pequenas quantidades, o fluido crevicular gengival desempenha um papel importante na defesa local, pois concentra inúmeros componentes moleculares e celulares do sistema imune. Na doença periodontal, torna-se um exsudato inflamatório abundante, que, por outro lado, ajuda a estabelecer um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos patogênicos (BARROS et al., 2016).

Figura 2 – Aspectos clínico-patológicos das doenças periodontais



Fonte: *Nat Rev Immunol*, 15 (1): 30-44, 2015 (HAJISHENGALLIS, 2015)

Felizmente, em estágios mais brandos de doença periodontal, como na gengivite, a efetiva fragmentação e remoção do biofilme microbiano subgengival por meio de medidas simples de higiene bucal, como escovação e uso do fio dental, por exemplo, é suficiente para reverter os danos inflamatórios causados aos tecidos gengivais. Caso contrário, a inflamação pode se estender aos demais tecidos periodontais, ocasionando a gradual e irreversível destruição das fibras do ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Neste nível, a doença passa a ser clinicamente reconhecida como periodontite (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Periodontite é um termo genérico usado para descrever um grupo heterogêneo de doenças periodontais, que compartilha o mesmo princípio etiológico básico, mas apresenta desfechos clínicos ligeiramente distintos, em detrimento da existência de um variado repertório de fatores etiológicos secundários (HARVEY, 2017). Neste contexto, as expressões fenotípicas de periodontite são geralmente enquadradas em duas classes gerais: crônica e agressiva. Estas por sua vez, se ramificam em formas localizadas e generalizadas, dependendo do número de áreas dentais comprometidas. Por fim, cada forma pode apresentar graus variados de destruição tecidual, sendo então classificadas como leve, moderada ou severa (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios para a determinação da severidade da periodontite

Critérios	Leve	Moderada	Severa
Profundidade das bolsas	>3 & <5 mm	≥5 & <7 mm	≥7 mm
Sangramento após sondagem	Sim	Sim	Sim
Perda óssea radiográfica	≥2 mm & ≤3 mm	>3 mm & ≤5 mm	>5 mm
Perda de inserção clínica	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥5 mm

Fonte: *Eur J Oral Sci*, 123 (6): 385-9, 2015 (LÓPEZ; BAELUM, 2015).

A periodontite crônica é caracterizada principalmente por um processo de destruição periodontal lento, que acomete indivíduos adultos em sua maioria. Os sinais clínicos básicos incluem: sangramentos associados a estímulos mecânicos, perda de inserção clínica e bolsas periodontais acompanhadas por perda óssea radiográfica. No entanto, visto que tais sintomas geralmente não são acompanhados de dor, a doença segue silenciosa até atingir níveis avançados de destruição tecidual. Nas formas severas, a periodontite crônica pode resultar em abscessos, halitose, dor ocasional ou desconforto, mastigação prejudicada e eventual perda do dente (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Por outro lado, a periodontite agressiva é uma doença de progressão rápida, que se manifesta tipicamente em indivíduos jovens (entre a puberdade e o início da terceira década de vida). A forte agregação familiar observada nesta doença indica que indivíduos com periodontite agressiva compartilham configurações genéticas herdadas que exacerbam as reações imuno-inflamatórias do hospedeiro frente às ameaças microbiológicas no periodonto, desproporcionalmente à extensão do biofilme microbiano (VAN DER VELDEN, 2017).

Embora a classificação das periodontites seja um instrumento útil para a determinação do prognóstico e para o estabelecimento de estratégias de tratamento e de manutenção a longo prazo, a literatura especializada ainda carece de critérios universais bem definidos, que possam garantir a classificação inequívoca dessas patologias (PAPAPANOU; SUSIN, 2017). Na Tabela 2, estão compilados os principais achados e características que justificam o estudo e manejo das periodontites crônica e agressiva separadamente, embora suas similaridades etiológicas e histopatológicas possam sugerir que ambas representam caminhos diferentes de uma mesma entidade patológica (LÓPEZ;

BAELUM, 2015). Ao longo das próximas sessões, o termo periodontite estará se referindo à forma mais prevalente desta doença, a periodontite crônica.

Tabela 2 – Achados característicos de periodontite crônica e periodontite agressiva

Periodontite crônica	Periodontite agressiva
<ul style="list-style-type: none"> • Mais prevalente em adultos, mas pode acometer crianças e adolescentes • O grau de destruição é proporcional à presença de fatores etiológicos locais • Presença frequente de cálculo subgingival • Associada com um padrão microbiológico variável • Progressão lenta a moderada, mas pode ocorrer períodos de rápida destruição • Pode também ser classificada com base na extensão e severidade • Pode estar associada com fatores de predisposição (ex.: fatores iatrogênicos) • Possivelmente modificada ou associada com doenças sistêmicas (ex.: diabetes mellitus, infecção por HIV) • Possivelmente modificada por fatores ambientais, tais como tabagismo e estresse emocional 	<ul style="list-style-type: none"> • Exceto pela presença de periodontite, os pacientes são clinicamente saudáveis • Rápida progressão na perda de inserção e na destruição óssea • Agregação familiar • Características secundárias (comuns, mas não universais): <ul style="list-style-type: none"> ○ Quantidades de depósitos microbianos (biofilme) são inconsistentes com a severidade da destruição periodontal ○ Proporções elevadas de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> e em algumas populações, de <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○ Anormalidades na função dos fagócitos ○ Macrófagos com fenótipos hiperresponsivos (elevados níveis de PGE₂ e IL-1β) ○ A progressão da destruição tecidual pode ser, alguns casos, contida naturalmente

Fonte: *Eur J Oral Sci*, 123 (6): 385-9, 2015 (LÓPEZ; BAELUM, 2015)

2.3 PERIODONTITE

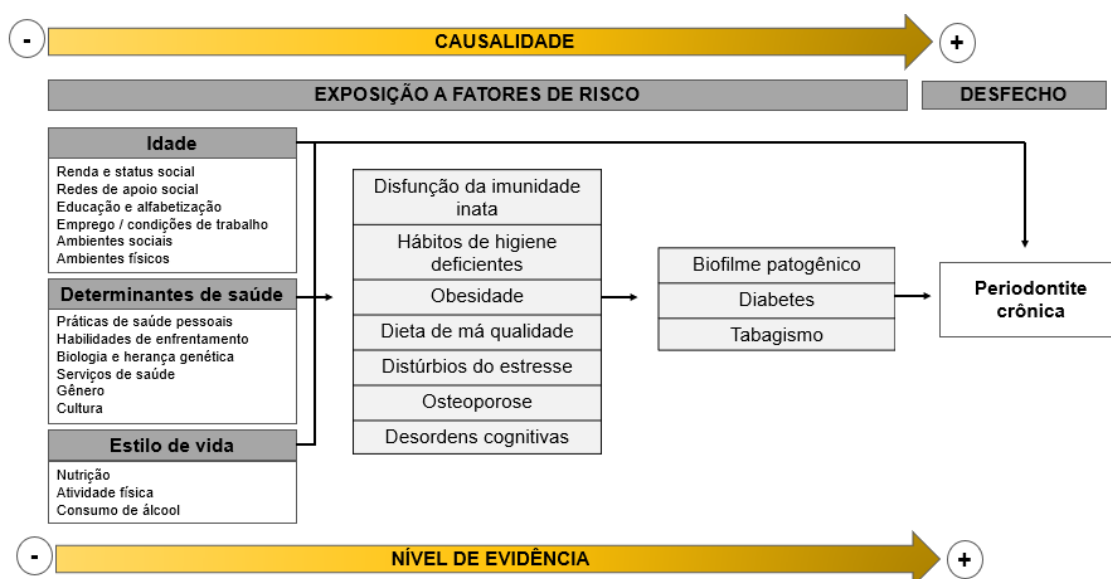
2.3.1 Aspectos patobiológicos gerais

O atual paradigma da patogênese periodontal sustenta a periodontite como uma doença imuno-inflamatória crônica de etiologia multifatorial, resultante da complexa e desarmoniosa relação entre o biofilme microbiano subgingival e o sistema imunológico do hospedeiro, estando esta relação sujeita à influência,

isolada ou combinada, de fatores microbiológicos, ambientais e imunogenéticos. Outro aspecto bem estabelecido é o de que, embora fatores de virulência bacterianos possam causar danos diretos aos tecidos, a maior proporção da destruição periodontal observada na periodontite é creditada à resposta imuno-inflamatória empreendida pelo hospedeiro (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; HARVEY, 2017).

Em suma, o desafio microbiológico no ambiente subgengival dá início a uma resposta inflamatória imediata, que a princípio pode trazer resultados benéficos, incluindo o total controle da infecção. No entanto, dependendo das linhagens patogênicas que predominam no biofilme e de seus fatores de virulência e mecanismos de escape (fatores microbiológicos), a resposta inflamatória pode falhar em vencer tal desafio (HAJISHENGALLIS, 2015). Neste caso, o constante estímulo microbiológico prolonga a inflamação, principalmente na ausência de medidas regulares de higiene bucal ou acompanhamento profissional (fatores ambientais) (LERTPIMONCHAI et al., 2017). Além disso, polimorfismos genéticos podem corromper vias de sinalização inter e intracelulares importantes para o correto funcionamento do sistema imunológico (fatores imunogenéticos), que acentuam ainda mais o quadro inflamatório que posteriormente se chamará periodontite (DA SILVA et al., 2017).

Portanto, as inúmeras possibilidades de interação entre fatores etiológicos secundários com a dinâmica da relação biofilme-hospedeiro (Figura 3) dá a cada pessoa um grau diferente de susceptibilidade e explica a variabilidade observada nos padrões de destruição tecidual em pacientes com periodontite. No entanto, embora um esboço tenha se delineado nos últimos anos, os mecanismos moleculares que regem essas interações ainda estão longe de estarem completamente esclarecidos (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

Figura 3 – Fatores envolvidos na patogênese da periodontite

Fonte: *J Clin Periodontol*, 44 (2): 125-131, 2017 (BOUCHARD et al., 2017)

2.3.2 Fator etiológico primário

Estima-se que cada mililitro de saliva humana contenha entre 100 milhões e 1 bilhão de células bacterianas. Isto representa uma pequena amostra da população microbiana que compõe o ecossistema da cavidade oral (microbioma oral), que também inclui uma grande variedade de outros microrganismos, como vírus e fungos (LARSEN; FIEHN, 2017). Mais de 700 espécies de bactérias podem colonizar a cavidade bucal humana. A maioria dessas espécies, no entanto, mantém uma relação simbiótica com seu hospedeiro. O microbioma oral está completamente integrado à fisiologia humana, desempenhando papéis importantes para a manutenção da saúde bucal, principalmente ao impedir a proliferação de espécies microbianas patogênicas (ROBERTS; DARVEAU, 2015).

As bactérias habitam as superfícies da cavidade oral predominantemente no formato de biofilmes, ou seja, microcolônias espacialmente estruturadas, formadas por múltiplas espécies bacterianas aderidas entre si e embebidas em substâncias orgânicas sintetizadas por elas próprias. Muito mais do que um amontoado desorganizado de bactérias, os biofilmes são comunidades altamente organizadas, nas quais seus integrantes desenvolvem complexas interações sociais (sejam elas cooperativas ou antagônicas) que modulam a estabilidade do biofilme e a homeostase necessária para o convívio saudável

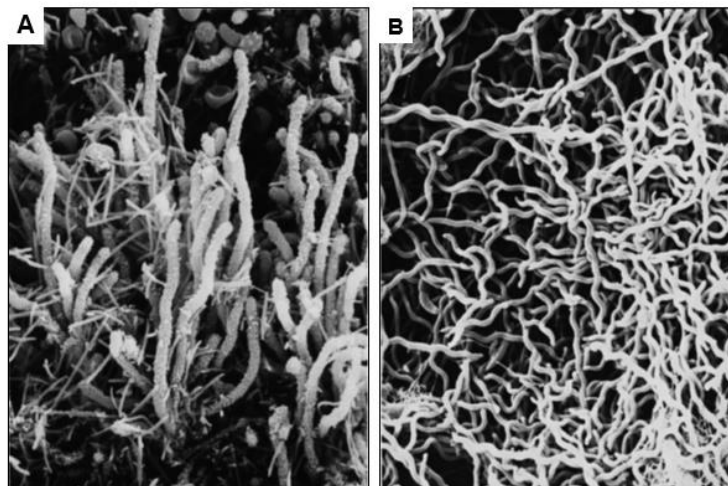
com o hospedeiro (LI; HUANG; TIAN, 2017). Além disso, este formato garante uma série de vantagens de sobrevivência. Por exemplo, o manto polissacarídico que cobre as bactérias do biofilme as tornam mais de mil vezes mais resistentes a antibióticos (HARVEY, 2017). Em superfícies dentais, o biofilme pode progressivamente acumular sais de fosfato de cálcio e adquirir uma crosta mineralizada conhecida como cálculo dental (ou tártaro), que oferece um grau adicional de resistência, inclusive contra a ação mecânica da escovação (AKCALI; LANG, 2018).

Na superfície dos dentes, a formação do biofilme (mais difundido como placa dental) se inicia quando bactérias dotadas de componentes bioquímicos específicos (adesinas) se ancoram a glicoproteínas salivares que naturalmente lubrificam as superfícies dentais. Estas bactérias iniciadoras passam a se multiplicar e sintetizar polímeros extracelulares, que não apenas reforçam sua própria aderência ao dente, mas também facilitam a aderência de outras espécies, desprovidas de adesinas. Nas primeiras horas, pelo menos 90 espécies diferentes de bactérias participam da formação do biofilme, das quais predominam bactérias aeróbias, representadas sobretudo por cocos gram-positivos do gênero *Streptococcus* e, mais tardiamente, por bacilos filamentosos do gênero *Actinomyces* (HELLER et al., 2016; LARSEN; FIEHN, 2017).

À medida que o biofilme adquire mais camadas microbianas, a difusão de oxigênio torna-se prejudicada, criando assim um ambiente mais propício à colonização por espécies anaeróbias. Assim, observa-se uma progressiva proliferação de bactérias gram-negativas e, portanto, um aumento na heterogeneidade de espécies microbianas no biofilme. Nos seus estágios finais de desenvolvimento, o biofilme passa a incorporar bactérias dotadas de maior motilidade, sendo, portanto, mais invasivas, como espiroquetas e bacilos flagelados (Figura 4) (HARVEY, 2017). Mais de 500 espécies distintas de bactérias já foram identificadas em biofilmes dentais humanos, no entanto, o perfil bacteriano pode variar significativamente entre diferentes indivíduos e mesmo entre áreas dentais adjacentes em um mesmo indivíduo. Na realidade, em condições saudáveis, a composição bacteriana de cada biofilme dental (espécies e abundâncias) parece obedecer a um padrão indivíduo-específico (“*fingerprints*” microbiológicos), que permanece relativamente estável ao longo

do tempo, embora também inclua componentes variáveis (HALL et al., 2017; UTTER; MARK WELCH; BORISY, 2016).

Figura 4 – Fotomicrografia eletrônica de biofilmes dentais



Fonte: *APMIS*, 125 (4): 376-384, 2017 (LARSEN; FIEHN, 2017). A: biofilme supragengival altamente diverso; B: biofilme subgengival dominado por espiroquetas.

Enquanto permanecem acima da margem gengival, as bactérias do biofilme dental obtêm nutrientes a partir de restos alimentares dissolvidos na saliva. Após 48 horas de crescimento ininterrupto (considerando a ausência de medidas adequadas de higiene oral), o biofilme atinge o espaço subgengival e gradualmente se expande em direção ao fundo do sulco gengival. Neste ambiente, o biofilme passa a extrair nutrientes dos tecidos periodontais e do fluido crevicular gengival. É também neste nicho que as bactérias do biofilme, assim como seus metabólitos, passam a entrar em contato direto com células apresentadoras de antígenos residentes no epitélio da gengiva, que alarmam o sistema imune quanto à presença de elementos potencialmente perigosos (HARVEY, 2017; HASAN; PALMER, 2014).

Embora as evidências deixem claro que o biofilme subgengival é o principal protagonista na patogênese da periodontite, ainda restam dúvidas se a doença surge pelo simples acúmulo bacteriano, independente das espécies envolvidas, ou se é provocada por uma ou mais espécies patogênicas presentes no biofilme. A hipótese mais amplamente aceita sustenta a ideia de que a periodontite é o resultado de uma desarmonia ecológica no biofilme, que envolve fatores intrínsecos a ele (alterações na virulência bacteriana), fatores imunológicos e fatores ambientais, favorecendo a proliferação desenfreada de

uma ou mais espécies patogênicas (DENG et al., 2017; HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). Este fenômeno, conhecido como disbiose, pode surgir, por exemplo, como consequência de alterações dietéticas ou nos hábitos de higiene bucal, de tratamentos médicos (uso de antibióticos ou medicamentos imunossupressores) ou em casos de imunodeficiências adquiridas, por exemplo (LARSEN; FIEHN, 2017).

Um dos maiores desafios da periodontia clínica na atualidade se concentra na identificação de assinaturas microbiológicas, ou seja, de possíveis combinações de patógenos periodontais, responsáveis pelo desencadeamento e progressão das respostas imunes destrutivas que caracterizam a periodontite. Esta tarefa é dificultada por inúmeros fatores, principalmente pela enorme variabilidade observada na composição dos biofilmes presentes em bolsas periodontais (HASAN; PALMER, 2014). No entanto, com o advento das técnicas moleculares de alto rendimento, muito progresso tem sido obtido nos últimos anos. A patogênese da periodontite tem sido principalmente creditada a espécies anaeróbias gram-negativas, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter spp.* (DENG et al., 2017; MEURIC et al., 2017).

2.3.3 Imunopatogênese: aspectos gerais

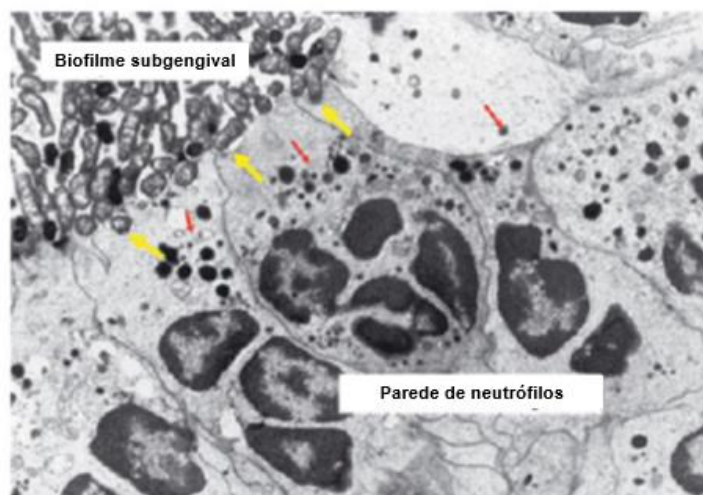
Ao contrário do intestino, o periodonto não possui uma barreira mucosa que restrinja o contato de seus hóspedes microbianos com as células que compõem sua superfície epitelial. Em contraste, o epitélio juncional, primeira estrutura periodontal a se defrontar com o desafio microbiológico, além de desprovido de queratina, é altamente poroso (junções intercelulares frouxas), o que o torna mais permeável do que a maioria dos epitélios (DARVEAU, 2010). Para lidar com as constantes ameaças de invasão microbiana, o periodonto conta com um orquestrado sistema de defesa. Para fins didáticos, o sistema imunológico do hospedeiro é dividido em duas frentes de defesa, classicamente reconhecidas como imunidade inata e imunidade adaptativa. A manutenção da saúde periodontal, no entanto, depende de uma resposta imune equilibrada, incapaz de causar danos significativos aos tecidos, porém, suficiente para impor

limites à invasão e proliferação patogênica do biofilme subgengival (CEKICI et al., 2014).

Compondo a linha de frente da defesa periodontal, a imunidade inata age mediante mecanismos não específicos, ou seja, que limitam o potencial de proliferação bacteriana independente da espécie ou patogenicidade. Tais mecanismos incluem a barreira física do epitélio queratinizado da gengiva, peptídeos antimicrobianos naturalmente secretados na saliva e no fluido crevicular gengival, e, principalmente, a transmigração de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) da microvasculatura para o sulco gengival e para os tecidos conjuntivos do periodonto (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018).

Estima-se que 30 mil neutrófilos transitem pelos tecidos periodontais a cada minuto. Indivíduos com neutropenias congênitas ou disfunções no tráfego de neutrófilos invariavelmente desenvolvem formas severas de periodontite, o que demonstra a crucial importância destas células da imunidade inata para a saúde periodontal (DARVEAU, 2010). Evidências histológicas sugerem que neutrófilos formam verdadeiras “paredes” entre os tecidos do hospedeiro e o biofilme microbiano (Figura 5). Esta barreira de contenção neutrofilica não apenas funciona como uma rede unificada de células fagocitárias, mas também como uma fonte secretória de substâncias bactericidas. As substâncias contidas nos seus grânulos são principalmente enzimas. Dentre estas, a enzima mieloperoxidase (MPO) promove a síntese de ácido hipocloroso, o qual é tóxico não apenas para as bactérias, mas também para as células residentes do periodonto (SCOTT; KRAUSS, 2011).

Figura 5 – Barreira de neutrófilos contra o avanço do biofilme subgengival



Fonte: *Front Oral Biol*, 15: 56-83, 2012 (SCOTT; KRAUSS, 2011). Setas amarelas mostram as tentativas de fagocitose e setas vermelhas indicam os grânulos tóxicos que são despejados no ambiente gengival.

Para assegurar a eliminação da ameaça microbiológica ao periodonto, células da imunidade inata dotadas de capacidades de reconhecimento e apresentação de antígenos microbianos (principalmente macrófagos teciduais e células dendríticas), invocam a presença de células altamente especializadas em neutralizar e matar patógenos específicos (linfócitos B e T). Estas células compõem a segunda frente de defesa do periodonto, a imunidade adaptativa, que além da alta especificidade, possui o artifício da memória imunológica, impedindo ou dificultando futuras infecções pelos mesmos patógenos (HASAN; PALMER, 2014).

É importante entender que, apesar de funcionalmente integrados, os dois braços do sistema imunológico estão temporalmente divididos. Visto que os componentes da imunidade inata já estão previamente formados e totalmente ativos, eles podem combater a infecção imediatamente. Por outro lado, vários dias são necessários para que o braço adaptativo se torne totalmente funcional (LEVINSON, 2016). Na maioria das infecções humanas, quando o sistema inato falha em controlar a infecção, os mecanismos celulares e humorais (mediados por anticorpos) da imunidade adaptativa são geralmente eficazes em eliminar a ameaça. A periodontite, no entanto, é um caso particular. O biofilme subgengival localizado acima do limite do epitélio juncional funciona como um reservatório bacteriano permanente. Assim, as batalhas imunes pela erradicação da infecção se perpetuam por tempo indefinido (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018).

As respostas imunes do hospedeiro contra a infecção periodontal são intrinsecamente dependentes de uma série de eventos moleculares e celulares que, a nível macroscópico resulta no que conhecemos como inflamação. Basicamente, o propósito da inflamação é facilitar o acesso de células imunes aos tecidos infectados. Assim, a maioria dos eventos inflamatórios se dão no ambiente vascular e perivascular, resultando, principalmente, em aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, e do metabolismo da matriz extracelular. Tais eventos são clinicamente percebidos pelos sinais de rubor, inchaço, calor e dor (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018). Vários mediadores liberados por células residentes do periodonto e por células imunes mediante estímulos microbianos, são essenciais para o fenômeno da vasodilatação. Entre tais mediadores, encontram-se os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas sintetizadas pela enzima cicloxigenase-2 (COX-2), e o óxido nítrico (NO), radical livre proveniente das reações de oxidação do aminoácido L-arginina promovidas pela enzima óxido nítrico sintetase-2 (NOS-2) (CEKICI et al., 2014).

Conceitualmente, a inflamação é categorizada em dois tipos: aguda e crônica. A inflamação aguda é uma resposta de curta duração, histologicamente caracterizada por um infiltrado maciço de células da imunidade inata, sobretudo neutrófilos. Na persistência do estímulo inflamatório, a inflamação torna-se crônica, podendo se estender por anos. Nesta fase, predominam as respostas da imunidade adaptativa, embora neutrófilos permaneçam ativamente presentes no local da infecção, no caso particular da periodontite (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). Na inflamação crônica, linfócitos e monócitos/macrófagos inundam os tecidos infectados seguindo gradientes quimiotáticos específicos. Tanto na inflamação aguda quanto na crônica, uma complexa rede de moléculas sinalizadoras, conhecidas como citocinas, regula a amplitude e a duração das respostas imunes (NEĐZI-GÓRA; KOWALSKI; GÓRSKA, 2017).

No periodonto, respostas inflamatórias contra infecções bacterianas podem ser entendidas como verdadeiras guerras imunológicas iniciadas com o objetivo de proteger o território periodontal de ameaças estrangeiras. Nesta analogia, uma bomba lançada sobre o inimigo inevitavelmente irá causar danos físicos ao território. Dessa forma, as lesões periodontais já se iniciam na fase aguda da inflamação, não apenas como consequência do poder de fogo inimigo

(virulência), mas principalmente como efeito colateral do armamento utilizado por neutrófilos e por células residentes do periodonto durante o combate (grânulos tóxicos e enzimas degradadoras de matriz) (EBERSOLE et al., 2017).

Após a eliminação dos invasores, mecanismos de cicatrização e reparo rapidamente devolvem aos tecidos sua vitalidade original. No entanto, se a guerra se estende por mais tempo (inflamação crônica), os mecanismos de reparo não conseguem acompanhar os estragos causados pela exposição excessiva dos tecidos periodontais a esta guerra imunológica. Fibrose e angiogênese são características histológicas comuns da inflamação crônica do periodonto, representando tentativas fracassadas de reparo tecidual. Pelo contrário, ajudam a criar um ambiente rico em nutrientes, que sustentam a proliferação patogênica do biofilme (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; KURGAN; KANTARCI, 2018).

2.3.4 Imunopatogênese: aspectos moleculares

As tentativas do hospedeiro de neutralizar a carga bacteriana periodontal envolvem mecanismos moleculares altamente complexos e integrados, que estão sob constante regulação, inclusive por circuitos de retroalimentação positiva e negativa. Na periodontite esta regulação é perdida, favorecendo a produção excessiva de determinados mediadores moleculares. No entanto, embora vários destes mediadores tenham sido identificados como peças importantes no desenvolvimento da periodontite, o exato caminho molecular da patogênese periodontal está ainda longe de estar totalmente trilhado (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

Embora os eventos moleculares que convergem na periodontite não obedeçam a uma ordem cronológica bem definida, o início de tais eventos se dá quando as células residentes do periodonto (células epiteliais, fibroblastos, macrófagos teciduais etc.), detectam a presença de microrganismos invasores. Este fenômeno é possível graças a existência de um repertório limitado de receptores celulares (receptores de reconhecimento de padrões – PRRs) que reconhecem determinados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou seja, componentes estruturais que os microrganismos preservaram ao longo da evolução, e que são naturalmente estranhos aos tecidos humanos.

PAMPs podem ser reconhecidos a partir de diferentes classes de moléculas microbianas, tais como lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas, flagelina, peptídeoglicanos, ácidos nucleicos, entre outras. A ligação de um PAMP ao seu respectivo PRR em uma célula periodontal promove a ativação de vias intracelulares que sinalizam à maquinaria transcricional destas células a produzir e secretar diferentes mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018).

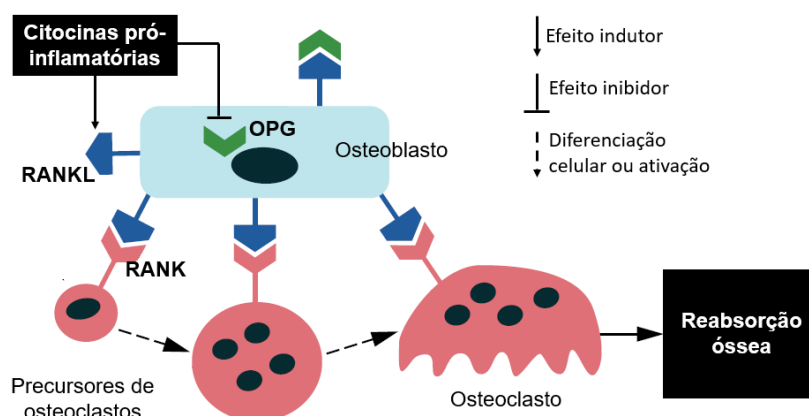
Uma família de proteínas conhecida como *toll-like receptors* (TLR) é a classe mais bem caracterizada de PRRs encontrada no periodonto. A ligação de produtos microbianos a estes receptores causa sua dimerização, e esta alteração conformacional promove o recrutamento de cinases para seu domínio citoplasmático, que, com a ajuda de moléculas adaptadoras, tais como o fator de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MYD88), induzem a ativação de fatores de transcrição nucleares que dirigem a expressão de potentes mediadores inflamatórios, como IL-1 β , interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), os quais passam a ser também secretados pelas células inflamatórias recrutadas para os locais infectados, amplificando assim o quadro inflamatório (SILVA et al., 2015a).

Estudos também têm revelado a importância de imunoreceptores solúveis no desencadeamento das respostas inflamatórias. É o caso do receptor associado à osteoclastos (OSCAR), um fator coestimulatório essencial para a formação de osteoclastos, mas que também é expresso por monócitos e células dendríticas e apresenta papel importante para sobrevivência, maturação e ativação destas células. A ligação de OSCAR em monócitos e neutrófilos resulta na indução de cascatas pró-inflamatórias que dão início às respostas imunes contra agentes infecciosos (NEMETH et al., 2011).

As citocinas pró-inflamatórias atuam sobre células residentes do periodonto estimulando a secreção de MMPs. Estas, por sua vez, degradam as fibras de colágeno, desfigurando assim a histologia gengival. Se não tratada, a inflamação se estende apicalmente e causa um desequilíbrio nos processos fisiológicos que regulam a reabsorção óssea. O principal mecanismo regulador deste processo é baseado na proporção entre duas moléculas pertencentes à família de ligantes e receptores de TNF: RANKL e osteoprotegerina (OPG), respectivamente. RANKL é expresso predominantemente como uma proteína de

membrana em osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T ativados. A ligação de RANKL ao receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANK) na superfície de células progenitoras, promove a diferenciação destas em osteoclastos maduros, os quais passam a secretar enzimas que degradam o osso (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018). A ação osteoclastogênica de RANKL, no entanto, pode ser bloqueada por OPG, o qual funciona como um receptor neutralizante de RANKL (Figura 6). Várias citocinas pró-inflamatórias são capazes de favorecer a osteoclastogênese por meio da indução da expressão de RANKL e repressão de OPG. O desequilíbrio na proporção RANKL/OPG é um dos fenômenos moleculares relacionados à patogênese periodontal mais bem estabelecidos na literatura (DARVEAU, 2010).

Figura 6 - Sistema RANK/RANKL/OPG na patogênese da periodontite

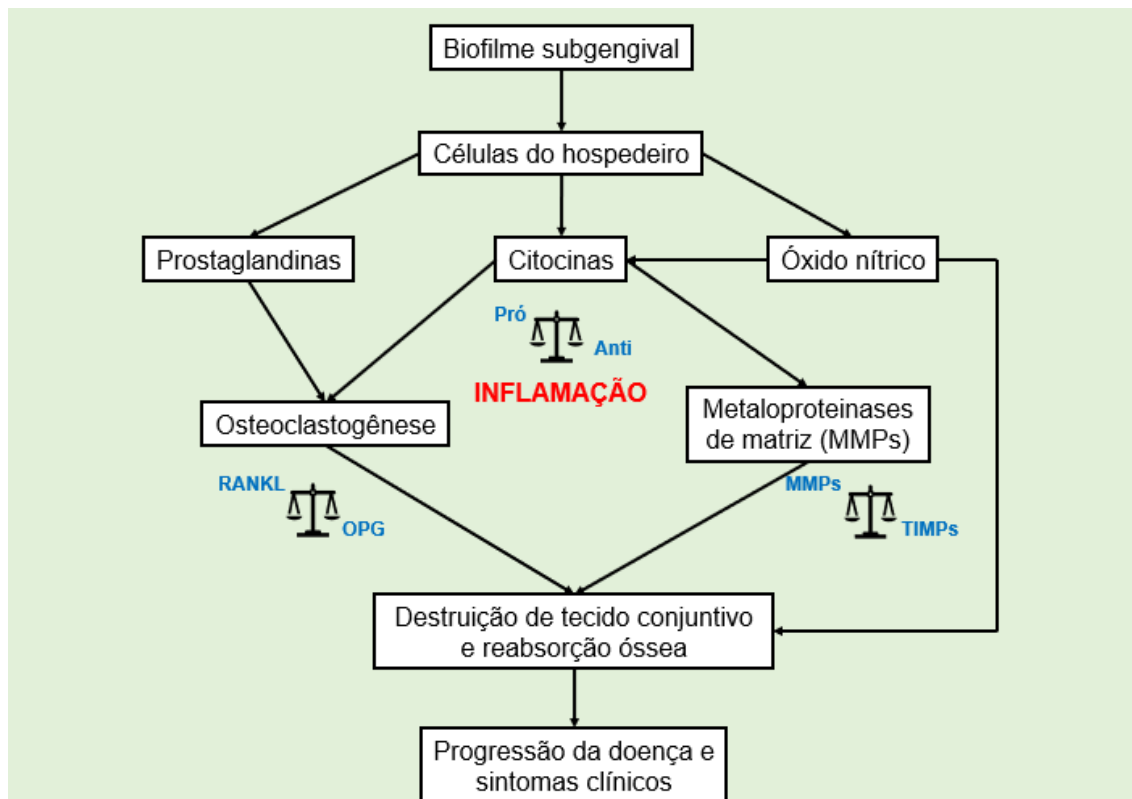


Fonte: *Expert Rev Mol Med*, 5;15:e7, 2013 (YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013)

Para conter a ação deletéria dos níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios e MMPs nos tecidos periodontais, o hospedeiro responde com o aumento de mediadores anti-inflamatórios, tais como as interleucinas 4 e 10 (IL-4/IL-10) e o fator de crescimento transformador beta (TGF β), e de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). Em condições normais, o periodonto encontra-se num estado permanente de inflamação controlada, no qual a ação destrutiva das citocinas inflamatórias é equilibrada pela expressão de citocinas anti-inflamatórias (SILVA et al., 2015a). A periodontite é o resultado de um desequilíbrio neste cenário (Figura 7), onde o constante estímulo microbiológico ocasiona a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e a consequente ativação e secreção de MMPs, fazendo com que a proteção oferecida pelas citocinas

antiflamatórias e TIMPs não seja suficiente para prevenir a destruição dos tecidos periodontais (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018).

Figura 7 - Resumo esquemático da patogênese da periodontite



2.3.5 Aspectos epidemiológicos

Cerca de 90% dos seres humanos são acometidos por alguma patologia oral ao longo de suas vidas (JIN et al., 2016). Além disso, os indicadores de saúde bucal não têm melhorado com o passar dos anos. Pelo contrário, o número de pessoas com doenças orais não tratadas aumentou em 40% entre 1990 e 2015. As doenças dentais e periodontais, por sua vez, representam a maior parcela destes casos. No ano de 2015, cerca de 3 bilhões de pessoas (entre crianças e adultos) foram afetadas por cáries e 538 milhões desenvolveram formas avançadas de periodontite, conseqüentemente levando a perda dentária em 276 milhões de pessoas no mundo inteiro (KASSEBAUM et al., 2017). Os custos referentes ao tratamento destas condições somaram US\$356,80 bilhões, correspondendo a 4,6% dos gastos globais com saúde em 2015. Além disso, perdas de produtividade totalizaram em US\$187,61 bilhões,

dos quais 67% foram atribuídos à perda dentária, 21% à periodontite severa e 12% à cáries (RIGHOLT et al., 2018).

A periodontite é a doença inflamatória crônica mais comum em humanos, e a principal causa de perda dentária em adultos, prejudicando não apenas a mastigação e o status nutricional, mas também a fala, autoestima, qualidade de vida e interação social (JIN et al., 2016). Além de ser uma das principais ameaças à saúde bucal, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a periodontite apresenta consequências sistêmicas, afetando especialmente o sistema cardiovascular (BEUKERS et al., 2017). Indivíduos com periodontite podem estar sujeitos a um risco 2 a 3 vezes maior de desenvolver acidente vascular cerebral (LEIRA et al., 2017). Embora os mecanismos que ligam uma doença à outra não estejam totalmente esclarecidos, algumas evidências sustentam que patógenos periodontais podem alcançar a circulação sistêmica através do epitélio gengival inflamado e iniciar uma cascata de reações inflamatórias que promovem alterações endoteliais (KHOLY; GENCO; VAN DYKE, 2015). Várias outras condições sistêmicas têm sido associadas à periodontite, incluindo doenças metabólicas, artrite reumatoide, adversidades gestacionais e câncer (NAZIR, 2017).

Levantamentos sobre a prevalência da periodontite costumam apresentar resultados altamente heterogêneos no mundo todo, refletindo a deficiência de definições claras e de critérios diagnósticos universais frente às diferentes manifestações clínicas da doença (PAPAPANOU; SUSIN, 2017). A estimativa é a de que a periodontite, em seus mais variados graus de progressão e severidade, afeta entre 20 e 50% da população mundial (NAZIR, 2017). No que se refere às formas severas da doença, a prevalência global estimada em 2010 foi de aproximadamente 11%, com pronunciadas diferenças geográficas. Países da Oceania apresentaram as menores prevalências (4,5%) e países da América do Sul as maiores (20,4%) (FRENCKEN et al., 2017).

No Brasil, inquéritos epidemiológicos promovidos pelo Ministério da Saúde são realizados periodicamente para diagnosticar a saúde bucal da população, afim de implementar ou otimizar programas de prevenção e tratamento oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). No último levantamento, realizado em 2010, foi constatado que 28,6% dos adultos examinados apresentavam cálculo dentário e 19,4% tinham bolsas periodontais

de 4 mm ou mais (BRASIL, 2012). Por outro lado, resultados de estudos independentes revelam que a prevalência de periodontite no Brasil pode variar de 9,5 a 83%, dependendo da região, da faixa etária analisada e dos critérios diagnósticos utilizados no estudo (BONFIM et al., 2013; CORRINI et al., 2008; SUSIN et al., 2011). Estudos sobre a prevalência dessa doença na região Nordeste são escassos, no entanto, o inquérito epidemiológico de 2010 revelou que as condições periodontais nas regiões Norte e Nordeste foram piores em todas os grupos etários, quando comparadas com as constatadas nas demais regiões (BRASIL, 2012).

Ao longo dos anos, tem sido evidente a crescente preocupação da população em geral em manter uma boa saúde bucal. O mercado global de higiene oral foi avaliado em US\$43,31 bilhões em 2017 e estima-se que atinja US\$53,97 bilhões em 2022. Acredita-se que a maior conscientização das pessoas sobre a importância da saúde bucal, o aumento na incidência de cáries e doenças periodontais, e os avanços tecnológicos incrementados aos produtos de higiene oral são os principais propulsores deste mercado (MARKETS AND MARKETS, 2017). Dados sobre vendas de produtos de cuidados pessoais no Brasil mostram um surpreendente aumento per capita na compra de cremes dentais (38%), escova de dentes (138%), fio dental (177%) e enxaguantes bucais (618,5%) no período entre 1992 e 2002. Um crescimento nas vendas também foi notado no período entre 2002 e 2006 (JARDIM; ALVES; MALTZ, 2009).

2.3.6 Aspectos terapêuticos

Tanto o diagnóstico quanto o tratamento das doenças periodontais requerem a colaboração ativa do paciente. No caso da periodontite, visto se tratar de um processo patológico indolor (portanto silencioso), cabe ao paciente estar atento aos sinais de inflamação na gengiva, ou submeter-se a avaliações periódicas com um periodontista, para que a doença possa ser diagnosticada e tratada ainda nos seus estágios iniciais. O exame clínico profissional envolve o uso de um instrumento graduado, de pequeno diâmetro, conhecido como sonda periodontal, que permite avaliar a profundidade do sulco gengival de diferentes áreas dentais (GRAZIANI et al., 2017). Basicamente, a identificação de bolsas periodontais associada a achados radiográficos com evidências de destruição

óssea caracteriza o diagnóstico de periodontite. Informações adicionais, tais como o histórico médico e familiar e características clínicas específicas (localização das lesões e proporção entre quantidade de biofilme e progressão da doença, por exemplo) podem ajudar a distinguir os diferentes fenótipos da doença (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

No entanto, é bastante comum que pacientes sejam diagnosticados com periodontite quando já apresentam um grau de comprometimento periodontal avançado. Isso se deve principalmente ao desconhecimento da população em geral a respeito dos sinais e sintomas da doença e de suas consequências, ao difícil acesso a serviços odontológicos públicos de qualidade, e em parte pela negligência (e até mesmo aversão) a consultas odontológicas (BONFIM et al., 2013). Porém, mesmo em estágios avançados, diferentes estratégias terapêuticas podem impedir que a doença atinja sua última consequência: a perda do dente. A completa remoção do biofilme ou cálculo dental situado acima e abaixo da margem da gengiva é a estratégia imediata a ser tomada, sendo realizada geralmente por raspagem mecânica manual, ou por meio de instrumentos ultrassônicos. Subsequentemente, as superfícies irregulares da raiz do dente são alisadas ou planificadas, dificultando assim a aderência de novo biofilme (GRAZIANI et al., 2017).

Uma vez que o acúmulo de bactérias orais sobre as superfícies dos dentes continuará a ocorrer naturalmente, o sucesso do tratamento periodontal (assim como a manutenção dos resultados) depende fundamentalmente da adesão do paciente a medidas minuciosas de higiene bucal e do seu compromisso em comparecer à avaliação profissional periódica. No Brasil, um estudo prospectivo de 5 anos observou que a recorrência da periodontite após intervenções terapêuticas foi significativamente mais baixa em pacientes que mantiveram visitas odontológicas em intervalos regulares. Além disso, foi observado que o risco de recorrência foi aproximadamente 4 vezes maior em indivíduos fumantes. Assim, a identificação e eliminação de fatores de risco modificáveis deve obrigatoriamente integrar o programa de tratamento da periodontite (COSTA et al., 2015).

Em alguns casos, especialmente nas formas severas de periodontite, a raspagem e alisamento radicular podem não ser eficientes em remover componentes do biofilme situados nos espaços mais profundos das bolsas

periodontais, impedindo assim o controle da inflamação e o restabelecimento da homeostase do periodonto. Nestes casos, parte da gengiva pode ser cirurgicamente separada dos tecidos subjacentes para dar acesso e melhor visibilidade à lesão. Uma variedade de procedimentos cirúrgicos também pode ser utilizada para reduzir a profundidade das bolsas periodontais, e para estimular a regeneração do suporte periodontal danificado, por meio da enxertia de materiais biocompatíveis ou substâncias biológicas regeneradoras (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). A terapia fotodinâmica tem recentemente ganhado destaque como uma modalidade menos invasiva de tratamento periodontal. Ela se baseia na aplicação de drogas sensíveis à luz no interior das lesões periodontais e subsequente exposição a um laser, o qual provoca sua fotodegradação. Os compostos tóxicos provenientes desta reação se encarregam de destruir a população bacteriana local (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Mesmo após minuciosos procedimentos cirúrgicos de limpeza, resquílios bacterianos ainda podem persistir nos tecidos periodontais, tornando necessário o uso de farmacoterapia antimicrobiana como estratégia complementar. Neste contexto, agentes antimicrobianos (incluindo antissépticos e antibióticos) podem ser administrados localmente ou sistemicamente por via oral, causando a morte direta das bactérias remanescentes ou impedindo sua proliferação (GRAZIANI et al., 2017). A antibioticoterapia sistêmica é geralmente reservada à pacientes com periodontite refratária ou em casos de doença altamente progressiva. Entre os antibióticos mais utilizados nesta modalidade de tratamento periodontal destacam-se o metronidazol, clindamicina, doxiciclina ou minociclina, ciprofloxacina, azitromicina e combinações de metronidazol com amoxicilina ou ciprofloxacina (HARVEY, 2017).

Apesar da comprovada eficácia como adjuvante na terapia periodontal, o uso de antibióticos sistêmicos apresenta uma série de restrições e de consequências inconvenientes (KEESTRA et al., 2015). Falhas no tratamento podem decorrer do descumprimento do esquema antibiótico prescrito, ou mesmo quando a prescrição recomendada não é suficiente em concentrar quantidades adequadas do antibiótico nos tecidos periodontais (FERES et al., 2015). Ambos os casos podem favorecer a seleção e proliferação de bactérias resistentes a antibióticos, um dos principais problemas médicos da atualidade. Um estudo nos

Estados Unidos revelou que patógenos subgingivais provenientes de pacientes com periodontite apresentaram resistência *in vitro* às concentrações terapêuticas dos antibióticos mais comumente utilizados na prática periodontal (RAMS; DEGENER; VAN WINKELHOFF, 2014). A administração sistêmica de antibióticos também promove um desequilíbrio geral no microbioma humano, gerando vários efeitos colaterais, como diarreia e candidíase vaginal. Além disso, há ainda a possibilidade de reações alérgicas e de interações medicamentosas e alimentares, que podem resultar em ineficácia terapêutica ou em efeitos adversos adicionais (HARVEY, 2017).

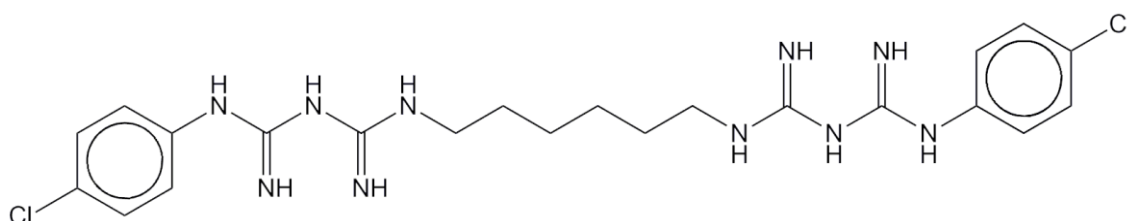
Os efeitos adversos da antibioticoterapia sistêmica podem ser parcialmente evitados por meio da aplicação local de agentes antimicrobianos. Esta estratégia também diminui as chances de induzir resistência bacteriana (FERES et al., 2015). Algumas formulações específicas (pó, gel, chips ou fibras) permitem a liberação controlada de altas concentrações do fármaco diretamente no interior das bolsas periodontais. Tais formulações são comumente utilizadas para tratar sítios periodontais com inflamação persistente, após a terapia mecânica primária. Entre as mais amplamente utilizadas estão as fibras de tetraciclina (Actisite[®]), doxiciclina em matriz bioabsorvível (Atridox[®]), microesferas de minociclina (Arestin[®]), e os chips de clorexidina (Perio chip[®]) (HARVEY, 2017). No entanto, revisões críticas publicadas nos últimos anos têm se deparado com limitações significativas que impedem uma clara avaliação da utilidade prática dos antimicrobianos tópicos. Além disso, alguns produtos tem sido criticados quanto à sua dificuldade de manuseio, rápida remoção das bolsas periodontais e altos custos de aquisição (FERES et al., 2015; GRAZIANI et al., 2017).

A clorexidina é um dos principais princípios ativos utilizados em sistemas de liberação intrabolsa periodontal (SAHNI et al., 2012). Isso se deve ao fato de se tratar do agente antimicrobiano mais amplamente estudado, cuja eficácia é comprovada contra a formação de biofilme dental. Por este motivo, a clorexidina também é considerada o padrão ouro com o qual devem ser comparados novos agentes antibiofilme em investigação (SANTOS et al., 2017). A clorexidina compõe enxaguantes ou sprays bucais (0,12 a 0,2%) e géis dentais (0,12 a 1%) rotineiramente utilizados nas práticas diárias de higiene pessoal para prevenção de cáries e inflamações na gengiva (KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2015).

Na clínica odontológica, irrigações com 0,2 a 1% de clorexidina são comumente aplicadas concomitantemente aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, com o objetivo de atrasar a recolonização subgengival (GRAZIANI et al., 2017).

A molécula de clorexidina (fórmula química: $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) é composta de duas estruturas simétricas com quatro anéis de clorofenil e dois grupos biguanida, ligados por uma ponte de hexametileno (Figura 8). Devido sua baixa solubilidade em água, é amplamente utilizada na forma de sais de clorexidina. O gluconato de clorexidina é a formulação antisséptica mais empregada, sendo um líquido amarelo pálido, quase incolor, e altamente solúvel em água. Este composto apresenta um amplo espectro de atividade bacteriana, no entanto, é mais efetivo contra bactérias gram-positivas. A molécula de clorexidina, por ter carga positiva, reage de maneira não específica com fosfolípidios de membrana carregados negativamente. Baixas concentrações de clorexidina (0,02 a 0,06%) são suficientes para alterar o balanço osmótico das células microbianas, promovendo a perda de quantidades significativas de íons potássio, o que leva a estagnação bacteriana (efeito bacteriostático). Em concentrações superiores a 0,12%, as moléculas de clorexidina causam danos de membrana irreparáveis, induzem alterações em proteínas citoplasmáticas e a precipitação das mesmas, resultando em morte celular alguns segundos após sua administração (efeito bactericida) (KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2015).

Figura 8 – Estrutura molecular da clorexidina



Fonte: American Chemical Society (www.acs.org)

No entanto, além da literatura científica não ser unânime quanto à eficácia da clorexidina no tratamento periodontal (para revisão, GRAZIANI et al., 2017), o uso prolongado desta droga (por mais de duas semanas) pode causar efeitos indesejáveis, como alteração na cor dos dentes, língua e restaurações dentárias, irritações na mucosa oral e distúrbios no paladar (KARPIŃSKI;

SZKARADKIEWICZ, 2015). O desenvolvimento de resistência bacteriana à clorexidina é uma preocupação mais recente. Um estudo realizado em 2016 demonstrou que o uso de altas concentrações de clorexidina (2%) foi incapaz de erradicar todas as células bacterianas coletadas de biofilmes subgengivais. Esta subpopulação de bactérias persistentes (0,1 a 1% da quantidade original) foi capaz de restaurar o biofilme completamente em oito semanas (SHEN et al., 2016). Outro estudo observou que bactérias menos suscetíveis à clorexidina, cultivadas a partir de biofilmes dentais, são também resistentes a múltiplos antibióticos, o que levanta o questionamento se o uso de produtos contendo clorexidina na rotina diária de cuidado oral está influenciando o surgimento de bactérias multidroga resistentes (SALEEM et al., 2016).

A terapia periodontal primária, com foco no combate ao biofilme dental, pode ainda ser potencializada com a modulação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, como por exemplo, pela redução da produção excessiva de citocinas e de enzimas destrutivas, ou pelo estímulo do processo regenerativo dos tecidos conjuntivos e ósseos do periodonto. Diferentes classes de drogas têm sido investigadas quanto a esse efeito modulador, incluindo anti-inflamatórios não esteroidais, tetraciclina, fatores de crescimento, bifosfonatos e proteínas morfogênicas do osso (GRAZIANI et al., 2017). A doxiciclina tem sido o melhor exemplo de agente modulador utilizado no manejo clínico da periodontite. Foi descoberto que, quando usada em baixas doses, esta tetraciclina perde seu efeito antimicrobiano e seu mecanismo de ação passa a ser exclusivamente pela inibição de MMPs (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Doses diárias de 20 mg de doxiciclina têm resultado em benefícios clínicos significativos como terapia complementar à raspagem e alisamento radicular (SMILEY et al., 2015).

Como um exemplo mais comum, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais convencionais e de inibidores seletivos de COX-2 também tem demonstrado efeitos positivos na modulação das respostas imuno-inflamatórias do hospedeiro, limitando as taxas de progressão de destruição óssea na periodontite. Porém, o uso dessas drogas anti-inflamatórias a longo prazo acarreta no aparecimento de efeitos colaterais tais como distúrbios gástricos, sangramento interno, risco aumentado de doenças cardiovasculares, entre outros. A existência de efeitos indesejados relacionados à farmacoterapia da

periodontite encoraja o desenvolvimento de produtos mais toleráveis com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas capazes de frear a perda óssea em pacientes com periodontite (FREIRES et al., 2018).

2.3.7 Modelos experimentais

Apesar das limitações em reproduzir fielmente todos os aspectos da patogênese periodontal em humanos, modelos animais há muito contribuem para o entendimento do desenvolvimento e progressão da periodontite, bem como para a investigação de novas abordagens terapêuticas. A periodontite pode ser experimentalmente induzida em uma variedade de animais (primatas não humanos, cães, ovelhas, roedores, entre outros) por diferentes metodologias. As mais comumente empregadas envolvem a inoculação de patógenos periodontais (ou de suas toxinas, como o LPS) nos tecidos gengivais, ou a inserção de um fio (algodão, seda ou nylon) ao redor da região cervical dos primeiros molares dos animais (modelo de ligadura) (DONOS et al., 2018). Embora a extensão da periodontite induzida experimentalmente seja dificilmente controlada (ou seja, a destruição periodontal pode ocorrer de forma lenta e contínua, com picos de exacerbação ou não), está claro que, em tais modelos pré-clínicos, tanto componentes da inflamação aguda quanto da inflamação crônica estão presentes nos sítios periodontais desafiados (GRAVES et al., 2012).

Ratos são os roedores mais amplamente empregados no estudo experimental da periodontite, principalmente por compartilharem algumas similaridades com os humanos, em termos de morfologia periodontal, anatomia da região de molares, desenvolvimento e composição do biofilme dental e histopatologia das lesões periodontais. Além disso, são uma alternativa mais barata, de fácil manuseio, e inclui a disponibilidade de animais de diferentes perfis genéticos e microbiológicos que se adequam a diferentes propostas de investigação (DONOS et al., 2018). No entanto, diferentemente dos humanos, estes roedores apresentam epitélio sulcular gengival queratinizado, o que concede a eles uma resistência adicional contra bactérias periodontais. Por esse motivo, a periodontite induzida por ligadura é o modelo geralmente mais adequado quando se utiliza ratos. A ligadura não apenas facilita o acúmulo de

biofilme, mas também causa a ruptura da barreira epitelial, tornando o periodonto vulnerável à invasão bacteriana. Neste modelo, a progressão da doença apresenta um padrão similar ao observado em humanos: gengivite com edema e ulceração epitelial, seguida por destruição óssea e pela formação de bolsas periodontais profundas (STRUILLOU et al., 2010).

Numerosas evidências demonstram o papel fundamental do componente bacteriano como gatilho das reações destrutivas no periodonto observadas no modelo de ligadura em ratos. Em ratos isentos de microbiota (*germ-free*), a lesão mecânica provocada pela ligadura não é suficiente em promover reações inflamatórias associadas a destruições teciduais significativas; no entanto, após a inoculação de bactérias gram-negativas, perda de inserção gengival e um aumento na reabsorção óssea são prontamente observados, podendo tais eventos serem freados pela aplicação tópica de agentes antissépticos. Neste modelo, a crucial participação das respostas do hospedeiro no processo de destruição periodontal também é evidente, como exemplificado pela redução da inflamação gengival, da osteoclastogênese e da reabsorção óssea com a aplicação de inibidores de prostaglandinas, ou pela redução da perda óssea alveolar após o uso de baixas doses de doxiciclina (GRAVES et al., 2012).

Uma recente revisão sistemática avaliou o perfil de estudos realizados nos últimos dez anos que utilizaram o modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos para avaliação terapêutica de compostos naturais, especificamente na prevenção de perda óssea alveolar (FREIRES et al., 2018). Entre os materiais de ligadura mais utilizados encontraram-se a seda (46,7%), algodão (20%) e o nylon (20%). Ratos da linhagem *Wistar* foram os mais empregados (80%), e as áreas ao redor dos primeiros molares foram as regiões mais frequentemente avaliadas (86,6%). O período de intervenção terapêutica variou de 9 a 30 dias, e na ampla maioria dos casos nenhum grupo de animais tratados com substância de referência foi utilizado. Em 66,7% dos estudos, a estimativa da perda óssea foi avaliada utilizando como parâmetro a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista do osso alveolar. Além disso, diferentes técnicas foram utilizadas para qualificar e quantificar o efeito terapêutico observado, incluindo histologia (86,7%), fotografia (13,3%) e microtomografia computadorizada (20%). Avaliações moleculares em nível de RNA mensageiro (mRNA) foi uma estratégia pouco explorada nestes estudos.

2.4 PRODUTOS NATURAIS E PERIODONTITE

Nos últimos anos, produtos naturais têm ganhado mais espaço e importância na indústria farmacêutica, a qual não só passou a capitalizar sobre produtos medicinais há muito utilizados por diferentes comunidades humanas, como também a explorar a extraordinária diversidade química desses produtos como fonte inspiradora de inovações farmacêuticas (DUTRA et al., 2016). Particularmente, o reino vegetal tem mostrado ser a fonte natural mais atrativa para a descoberta de novos fármacos, dado o imenso e variado repertório químico oriundo de cada espécie de planta que habita o globo. No atual mercado multibilionário da indústria farmacêutica, cerca de 40% dos produtos comercializados são desenvolvidos a partir de fontes naturais, dos quais 75% são derivados, direta ou indiretamente, do reino vegetal (FREIRES et al., 2018).

No que se refere à periodontite, as atuais opções farmacoterapêuticas incluem drogas sintéticas, semissintéticas ou de origem completamente natural. Cabe notar, no entanto, que 25% dos anti-inflamatórios e 73% dos antimicrobianos atualmente liberados no mercado são desenvolvidos ou inspirados a partir de produtos naturais (DA SILVA; RODRIGUES, 2014; FREIRES et al., 2018). Uma grande variedade de espécies vegetais tem mostrado eficácia contra biofilmes polimicrobianos formados *in vitro*, *ex vivo* e *in situ* (KARYGIANNI et al., 2016). Uma recente meta-análise realça evidências de que a aplicação local de produtos naturais, em complemento à raspagem e alisamento radicular, pode promover benefícios clínicos significativos no manejo terapêutico de pacientes com periodontite, quando comparado ao uso isolado da terapia mecânica (MORO et al., 2018).

Uma grande variedade de produtos naturais de origem vegetal (extratos, óleos essenciais, moléculas isoladas etc.), vem continuamente sendo testada experimentalmente quanto à capacidade de proteger o periodonto das consequências destrutivas da inflamação desencadeada pelo biofilme bacteriano. Apesar da maioria dos compostos até então testados demonstrarem fraca ou moderada atividade protetora, alguns exemplos notáveis podem ser citados, como o caso da formulação em gel combinando extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e óleo essencial de alecrim-grande (*Lippia sidoides*),

que mostrou reduzir reabsorção óssea (45 a 65%) em modelo experimental de periodontite induzida por ligadura em ratos. Neste mesmo modelo, os extratos de *Ginkgo biloba* (planta de origem chinesa) e de própolis também se mostraram altamente eficazes em modular a reabsorção óssea associada a periodontite (FREIRES et al., 2018).

O Brasil possui uma biodiversidade vegetal exuberante, com mais de 45 mil espécies de plantas descritas, representando cerca de 20% da flora mundial. Esta diversidade põe o país numa posição vantajosa no cenário da pesquisa de potenciais agentes terapêuticos. Entre 2011 e 2013 mais de 10 mil artigos científicos foram publicados por pesquisadores brasileiros reportando resultados sobre o efeito terapêutico de agentes naturais derivados de plantas. No entanto, poucos são os resultados que efetivamente levam ao desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, a proteção intelectual por meio do depósito de patentes não tem acompanhado o ritmo das publicações acadêmicas (DUTRA et al., 2016).

Grande parcela desta discrepância pode ser atribuída à falta de priorização de investimentos federais em Ciência e Tecnologia. A maioria dos grupos de pesquisa do país carecem de recursos para investigações mais detalhadas, como as relacionadas ao isolamento e caracterização de princípios ativos, ao mecanismo de ação terapêutica, aos efeitos tóxicos, entre outros. Na grande maioria dos casos, as pesquisas nacionais com plantas e seus derivados se limitam a explorar o efeito terapêutico de extratos brutos, frações ou óleos essenciais, geralmente utilizando modelos *in vitro* e animais (DUTRA et al., 2016). Estas limitações prejudicam a realização de ensaios clínicos abrangentes, distanciando a população em geral dos possíveis benefícios de novas descobertas terapêuticas.

Um ensaio clínico randomizado controlado e duplo cego, realizado para avaliar a eficácia do óleo essencial de *Lippia sidoides* no controle do biofilme dental e no tratamento de gengivite apresentou resultados significativamente semelhantes aos obtidos com o tratamento padrão com clorexidina 0,12%, tanto nos parâmetros clínicos quanto nos microbiológicos (BOTELHO et al., 2009). Outro estudo, com as mesmas configurações (inclusive utilizando clorexidina 0,12% como controle), concluiu que o uso de enxaguante bucal à base de folhas de *Azadirachta indica* (conhecida popularmente como nim) pode ser uma

alternativa altamente eficaz no tratamento de doença periodontal (BOTELHO et al., 2008). Ambos os estudos, realizados no Brasil, dão uma ideia dos benefícios terapêuticos que o uso de agentes naturais derivados de plantas pode proporcionar à saúde periodontal.

2.4.1 *Anacardium occidentale* Linn

O cajueiro comum (espécie *Anacardium occidentale* Linn.), árvore de médio a grande porte pertencente à família *Anacardiaceae* (Figura 9A), é um dos melhores exemplos do potencial econômico da biomassa vegetal do Brasil. Sua madeira, que é resistente a água, é explorada na engenharia marítima e civil; seu pedúnculo (pseudofruto) é aproveitado para a fabricação de diversos produtos, principalmente sucos, doces, geleias, entre outros; além disso, possui as castanhas comestíveis mais amplamente comercializadas no mercado internacional; até mesmo a casca do tronco, folhas e flores podem ser aproveitados, sendo comumente usados na medicina popular contra diarreias e cólicas, e para a cicatrização de feridas (DA SILVA; RODRIGUES, 2014).

Figura 9 - Cajueiro comum (*Anacardium occidentale* Linn)



Fonte: Embrapa. A: Visão geral do cajueiro; B: Flores; C: Pedúnculo (pseudofruto, conhecido como caju) e castanha do caju (fruto).

Nativa do Nordeste brasileiro, *A. occidentale* L. está adaptada a solos de baixa fertilidade, a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico, representando

uma importante fonte de renda para a região Nordeste do país. Em 2005, o Brasil exportou 98 toneladas de produtos derivados do cajueiro, no valor de US\$181,6 milhões. O cultivo de *A. occidentale* ocupa cerca de 700 mil hectares em todo território nacional e o Nordeste sozinho é responsável por 94% da produção, estando as maiores plantações concentradas nas regiões costeiras dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (BEZERRA et al., 2007).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm voltado a atenção para as propriedades farmacêuticas e biotecnológicas de *A. occidentale*. Vários produtos naturais derivados desta planta têm sido associados à diminuição dos efeitos destrutivos promovidos pela inflamação, além de demonstrarem propriedades analgésicas, antioxidantes, cicatrizantes e antimicrobianas (CAMPOS et al., 2012; DA SILVEIRA VASCONCELOS et al., 2015; PAWAR et al., 2000; VANDERLINDE et al., 2009). Diversas evidências advindas de estudos *in vitro* justificam o interesse da exploração do cajueiro para fins terapêuticos na área odontológica, especialmente para o tratamento ou prevenção de doenças periodontais. O extrato das folhas do cajueiro demonstrou ser capaz de inibir a secreção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos desafiados com LPS (SOUZA et al., 2017), apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos periodontais *P. gingivalis* e *P. intermedia* (VARGHESE et al., 2013), e se mostrou superior a enxaguantes bucais convencionais quanto à supressão de biofilmes formados por patógenos orais (SHETTY et al., 2015). O extrato etanólico das flores de *A. occidentale* foi eficaz em inibir o crescimento em cultura de 14 espécies microbianas distintas (DA SILVA et al., 2016). Já o extrato hidroalcoólico da casca do caule possuiu efeito inibitório sobre a aderência e proliferação de três espécies de *Streptococcus* isoladas de biofilme dental (MELO et al., 2006).

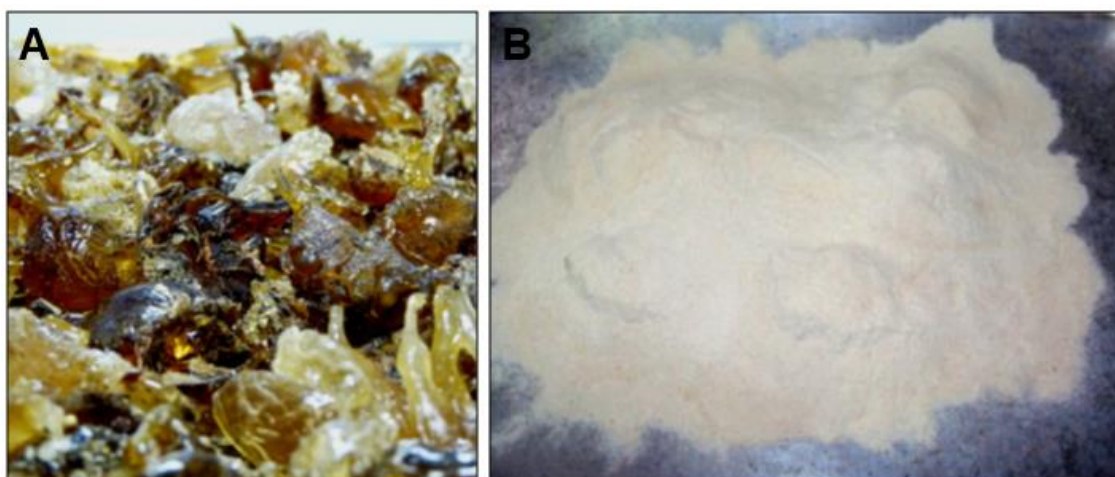
Os resultados preliminares de estudos *in vitro* com diferentes extratos brutos do cajueiro encorajam a realização de estudos mais detalhados sobre seu efeito terapêutico em modelos de periodontite experimental em animais. Em tais modelos, torna-se possível não apenas avaliar o efeito dos possíveis agentes terapêuticos sobre o biofilme bacteriano, mas também sobre as repostas imuno-inflamatórias do hospedeiro, assim como seus efeitos tóxicos. Além disso, o cajueiro oferece uma diversidade de outros produtos que merecem atenção, como é o caso do exsudato encontrado no tronco ou em seus ramos, que também se mostrou promissor como agente antibacteriano *in vitro* (CAMPOS et

al., 2012). Além de promover o desenvolvimento científico e tecnológico do país, a investigação das potencialidades terapêuticas de *A. occidentale* representa uma importante estratégia para agregar valor à biodiversidade brasileira, impulsionando também o desenvolvimento social e econômico, principalmente das regiões semiáridas do Nordeste.

2.4.2 Goma do cajueiro

As células epiteliais que compõem a casca do caule e ramos do cajueiro produzem e estocam em seus compartimentos citoplasmáticos um fluido viscoso conhecido como goma do cajueiro (GC). Em cajueiros com idade acima de dois anos, esta substância é liberada (ou exsudada) para o meio externo como mecanismo de defesa contra lesões mecânicas, insetos e microrganismos. Uma vez exposta ao ar do ambiente, a GC adquire uma consistência sólida devido à evaporação de líquidos, tornando-se uma resina de coloração amarelada ou marrom-escuro (Figura 10A) (DA SILVA et al., 2018; TORQUATO et al., 2004). Além disso, esta resina é levemente perfumada, possui sabor ácido, e é regularmente solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos (FURTADO et al., 2013).

Figura 10 – Goma do cajueiro



Fonte: Embrapa. A: exsudato como encontrado *in natura*; B: goma purificada

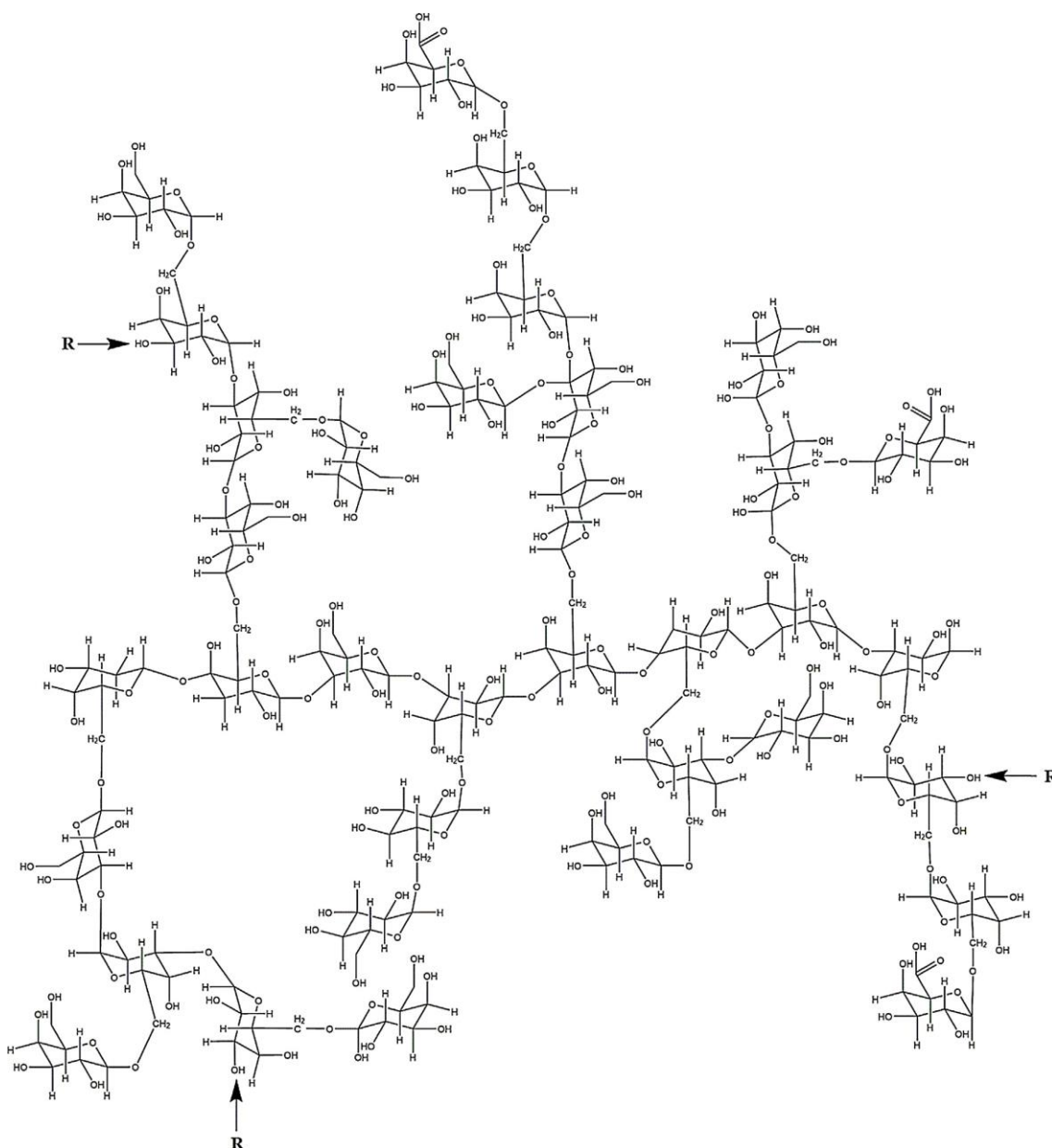
Goma é um termo genérico usado para designar um grupo de polímeros e seus derivados naturalmente encontrados ou extraídos de vegetais terrestres,

marinhos ou microrganismos. São substâncias químicas hidrofílicas, de elevada massa molecular e de natureza polissacarídica, que apresentam propriedades coloidais, e que, quando adicionadas a solventes orgânicos, formam suspensões altamente viscosas, com funções espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes, as quais podem ser exploradas em uma infinidade de aplicações industriais (FURTADO et al., 2013; TORQUATO et al., 2004). No cajueiro, a extração da goma ocorre a partir da casca do caule, após incisões físicas ou pela aplicação de substâncias químicas tais como o óxido de etileno, ácido 2-cloroetilfosfônico e derivados do ácido benzóico. A goma coletada pode ser refinada seguindo-se etapas de solubilização, centrifugação, filtração e precipitação em etanol. Em seguida, ao passar por uma etapa de secagem, obtém-se um pó (Figura 10B) com elevado teor polissacarídico (RIBEIRO et al., 2016).

Os polissacarídeos naturais que compõem as gomas de diferentes espécies de plantas distinguem-se tanto em relação à sua configuração química (arranjos lineares ou ramificados), quanto às suas unidades monoméricas constituintes. Além disso, tais unidades, unidas entre si por ligações glicosídicas, podem se combinar de infinitas maneiras, conferindo a estes polissacarídeos uma enorme variedade de propriedades reológicas, dificilmente mimetizadas por polímeros sintéticos (RIBEIRO et al., 2016).

Particularmente, a GC é um heteropolissacarídeo ácido ramificado. A proporção individual de suas unidades monoméricas depende de vários fatores, tais como composição do solo, idade da árvore, tempo de exsudação, época do ano e condições climáticas (FURTADO et al., 2013). Em amostras extraídas de cajueiros cultivados em solo brasileiro, observou-se como seus principais constituintes: galactose (59 – 82%), glicose (6 – 14%), ácido glicurônico (1,3 – 13,5%), arabinose (4 – 5%), ramnose (2 – 4%) e manose (1%), além de pequenas quantidades de xilose e ácido etilglicurônico (ARAÚJO et al., 2012; MENESTRINA et al., 1998; PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998; SILVA et al., 2010). Sua estrutura de galactano é altamente ramificada, apresentando cadeias com ligações β -(1-3) e β -(1-6) D-galactose (Figura 11). Além disso, durante a polimerização da goma, algumas proteínas podem ficar retidas na malha polimérica (SILVA et al., 2010).

Figura 11 - Estrutura molecular de um fragmento da goma do cajueiro



Fonte: *Carbohydr Polym*, 147: 188-200, 2016 (RIBEIRO et al., 2016). R representa radicais polissacarídicos.

A GC tem potencial para inúmeras aplicações tecnológicas: na indústria do papel, ela pode substituir a cola líquida; na indústria de bebidas e alimentos, pode ser utilizada como estabilizador da espuma da cerveja, como conservante natural do sabor de alimentos industrializados, e na preservação de cristais de açúcar nas indústrias de sorvete, com o objetivo de evitar o seu descongelamento rápido. Além disso, a indústria farmacêutica vem demonstrando um crescente interesse por esse material, o qual pode ser usado na fabricação de capsulas e comprimidos, servindo como aglutinante de seus

componentes (FURTADO et al., 2013). Este potencial mercadológico da GC decorre principalmente do fato de se tratar de um produto natural barato, renovável e amplamente disponível (independente da época do ano), além de ser biodegradável e não tóxico (KUMAR et al., 2012). Considerando que um cajueiro pode exsudar por ano uma média de 700 g de goma, o Brasil possui potencial para produzir cerca de 40 mil toneladas de GC anualmente para fins industriais (CUNHA et al., 2007).

Diversas evidências indicam que a GC também apresenta propriedades farmacológicas intrínsecas, e pode compor formulações não apenas como mero excipiente farmacêutico, mas como componente ativo no combate a diferentes condições de saúde. Um estudo *in vitro* demonstrou que a aplicação tópica da goma do cajueiro protegeu a mucosa laríngea de danos causados por soluções que mimetizavam o suco gástrico humano, abrindo novas perspectivas para o tratamento de refluxo laringofaríngeo. Além das propriedades bioadesivas, os autores também consideraram que suas propriedades antioxidantes podem ter contribuído para o efeito protetor (FIGUEIREDO et al., 2017). Em modelo animal, a GC também apresentou efeito gastroprotetor. A prévia administração da GC em ratos, por gavagem, mostrou reduzir os danos à mucosa gastrointestinal induzidos por naproxeno, um AINE comumente prescrito. O estudo mostrou evidências de que o efeito protetor conferido pela GC pode decorrer tanto de sua atividade antiinflamatória (reduziu os níveis de MPO), como de suas propriedades antioxidantes (CARVALHO et al., 2015). Em camundongos, a GC apresentou excelente efeito antidiarreico em diferentes modelos de indução (agudo, inflamatório e secretório). Embora o mecanismo não tenha sido esclarecido, foi sugerido que a GC possa inibir a motilidade gastrointestinal, reduzindo o acúmulo de fluido intestinal e a secreção de água e íons cloreto no lúmen do intestino (ARAÚJO et al., 2015).

A GC parece também exercer um papel na modulação do sistema imuno-inflamatório. Um estudo *in vitro* testou o efeito modulatório da GC sobre macrófagos peritoneais de camundongos. A GC induziu um aumento significativo nos níveis de IL-10, a qual foi considerada ser responsável por inibir a produção de interferon gama (INF- γ) por macrófagos estimulados com LPS, e a subsequente produção de NO por estas células. Este efeito foi atribuído principalmente ao conteúdo polissacarídico da GC (YAMASSAKI et al., 2015).

Por outro lado, outro estudo destacou o papel de outros componentes da GC na modulação das respostas imuno-inflamatórias. Em camundongos, foram observadas evidências de propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias da fração livre de polissacarídeos da GC. O estudo revelou que esta fração é composta principalmente por ácidos anacárdicos, moléculas derivadas do ácido salicílico, com cadeias alquílicas saturadas ou insaturadas e de comprimento variável. Os efeitos observados foram relacionados à capacidade dos ácidos anacárdicos de interferirem no metabolismo do ácido araquidônico, provavelmente pela inibição da atividade ou expressão de COX-2, reduzindo assim a produção de mediadores inflamatórios (DA SILVA et al., 2018).

Em estudo pioneiro, Marques et al. (1992) observaram que soluções concentradas de GC bruta inibiram o crescimento de três dentre cinco espécies bacterianas analisadas (*Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*), apresentando o mesmo efeito para uma dezena de espécies de fungos (MARQUES; ALBUQUERQUE; XAVIER-FILHO, 1992). Utilizando a GC purificada, por outro lado, Torquato et al. (2004) não foram capazes de observar qualquer efeito antimicrobiano. Os autores sugeriram que o efeito antimicrobiano da GC pode ser atribuído aos ácidos anacárdicos que a compõe, e os mesmos observaram que houve uma drástica redução de ácidos anacárdicos (88%) após o processo de purificação da GC (TORQUATO et al., 2004). Quelemes et al. (2013) também relataram ausência de efeito antimicrobiano em todas as espécies bacterianas testadas com GC purificada (QUELEMES et al., 2013).

No entanto, os resultados relatados por Asantewaa et al. (2011) revelaram que nem a GC bruta nem a purificada apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações investigadas (ASANTEWAA et al., 2011). Por outro lado, o estudo realizado por Campos et al. (2012) mostrou que tanto a GC bruta quanto a GC purificada apresentaram efeito antimicrobiano sobre bactérias gram-positivas; a GC purificada ainda foi capaz de inibir o crescimento de algumas bactérias gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*. O mesmo estudo revelou, por meio de imagens de microscopia de força atômica, que o possível mecanismo de ação da GC é por meio da desintegração da estrutura bacteriana após interação com a parede celular (CAMPOS et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado uma relativa segurança do uso da GC para fins terapêuticos. Em ratos da linhagem Wistar, a aplicação intraperitoneal

de altas doses de GC purificada (até 4000mg/kg) não produziu efeitos tóxicos em nenhum dos animais testados (n = 6). Nestes animais, a administração contínua de doses de 250mg/kg por um período de 30 dias não influenciou o *status* nutricional, e não foram observadas alterações em parâmetros hematológicos quando comparado ao grupo não tratado (KUMAR et al., 2009). Por outro lado, a fração livre de polissacarídeo da GC causou morte e alterações comportamentais em camundongos, após administrações intraperitoneais de doses de 1000mg/kg (DA SILVA et al., 2018). Em coelhos, foi relatado ausência de efeitos adversos após administração via intragástrica de até 5000mg/kg de GC purificada (OKOYE; ONYEKWELI; KUNLE, 2012).

Devido sua baixa toxicidade e suas potencialidades como possível agente imunomodulatório, antimicrobiano e antiinflamatório, a GC se mostra um candidato promissor no tratamento ou prevenção de doenças imuno-inflamatórias induzidas por patógenos microbianos, como é o caso da periodontite.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito terapêutico de formulações em gel orabase contendo goma de *Anacardium occidentale* Linn. em ratos com periodontite induzida por ligadura.

3.2 ESPECÍFICOS

- Purificar a GC a partir do exsudato de *Anacardium occidentale* Linn.;
- Preparar formulações em gel orabase, a partir de diferentes concentrações de GC;
- Induzir periodontite em ratos por meio de protocolo de ligadura pré-estabelecido e administrar por via tópica diferentes formulações orabase contendo GC ou tratamentos controle ao longo de 20 dias;
- Avaliar características biométricas, como massa corporal (antes e após tratamento) e massa relativa de órgãos (após período de tratamento) como indicativo de toxicidade sistêmica;
- Analisar parâmetros bioquímicos e inflamatórios no tecido periodontal e sanguíneo para avaliação da influência dos tratamentos sobre a função renal e hepática e sobre o *status* inflamatório local e sistêmico;
- Avaliar as características morfométricas relativas à perda de osso alveolar;
- Analisar o perfil de expressão do mRNA de genes relacionados a processos infecciosos e inflamatórios e à homeostase da matriz extracelular;
- Comparar os parâmetros analisados entre grupos tratados com as formulações contendo GC e um grupo tratado com um agente antibiofilme padrão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO

A obtenção da GC se deu a partir do exsudato (goma bruta) do tronco de cajueiros nativos do município de Ilha Grande – PI (02° 51' 28" S; 41° 49' 15" O), com *voucher* de herbário nº52 / UFPI, por intermédio do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). O procedimento de extração e purificação do GC foi adaptado do método originalmente descrito por Paula et al. (1998), em resumo: a goma bruta foi primeiramente triturada e dissolvida em água destilada (26°C) de forma a gerar uma solução a 10% (m/v); após completada a dissolução, o pH inicialmente ácido da solução foi ajustado para aproximadamente 7,0 pela adição de uma solução diluída de hidróxido de sódio, gerando uma solução de cor clara, que, subsequentemente foi filtrada por meio de passagens sucessivas por um filtro de vidro sinterizado; a GC foi precipitada com etanol na proporção de 1:3 (GC: etanol; v/v) e seco em um forno de ar forçado a 60°C durante oito horas (PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). A contaminação com elementos proteicos foi verificada por meio de análise elementar, utilizando o equipamento *Perkin Elmer 2400 series II elemental analyzer* (Perkin-Elmer, USA). O peso molecular da GC purificada foi estimado pela técnica de dispersão dinâmica de luz utilizando um laser de 633 nm, em um ângulo de dispersão fixo de 173°, com o equipamento *Zetasizer Nano ZS*, modelo 3600 (Malvern Instruments, UK).

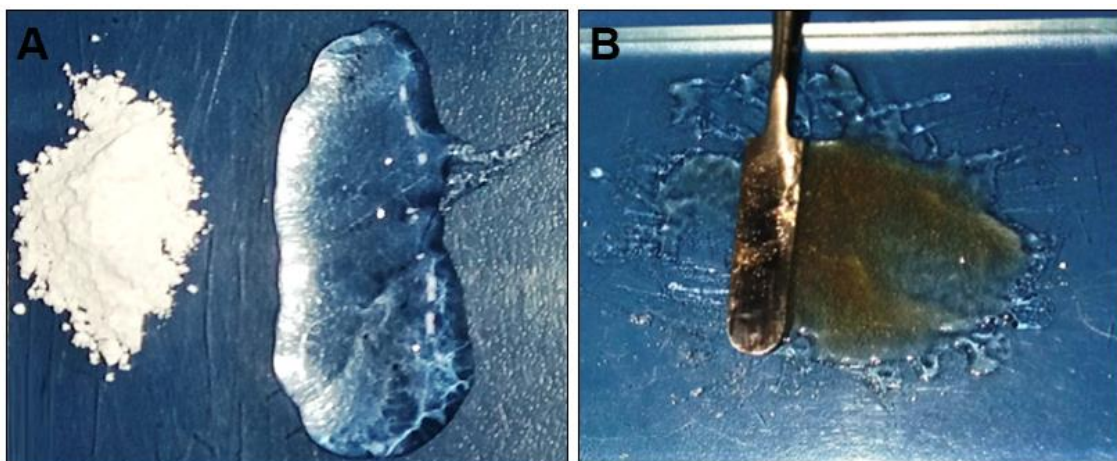
4.2 FORMULAÇÕES EM GEL ORABASE CONTENDO GC

Para a preparação das formulações em gel contendo GC foi utilizado um gel orabase de uso comum em odontologia como veículo, facilmente obtido em farmácias de manipulação. Este gel-veículo é um composto relativamente inerte, contendo carbopol 934P (2%), um polímero mucoadesivo e gelificante comumente utilizado como adjuvante em sistemas de administração de medicamentos bioadesivos, e que apresenta segurança comprovada para uso em mucosa oral (NAKANISHI; KAIHO; HAYASHI, 1998). Os demais constituintes

incluem: p-hidroxibenzoato de metilo (0.1%) como conservante; etanol a 98% (0.6%) como solvente; propilenoglicol (1%) como umectante; e água pura como veículo. Além disso, trietanolamina (1%), uma base fraca, é usada para ajustar o pH deste gel para 6,5.

Foram preparadas formulações em gel com duas concentrações diferentes de GC. Para cada 1g do gel-veículo foram adicionados 50 mg de GC (5%) ou 150 mg (15%). GC e gel orabase foram colocados sobre uma lâmina de vidro e misturados com uma espátula de metal, até a formação de misturas homogêneas (Figura 12), as quais foram colocadas em tubos plásticos com tampa flip-top e armazenadas em geladeira a 6-8 °C.

Figura 12 - Preparo das formulações em gel contendo GC



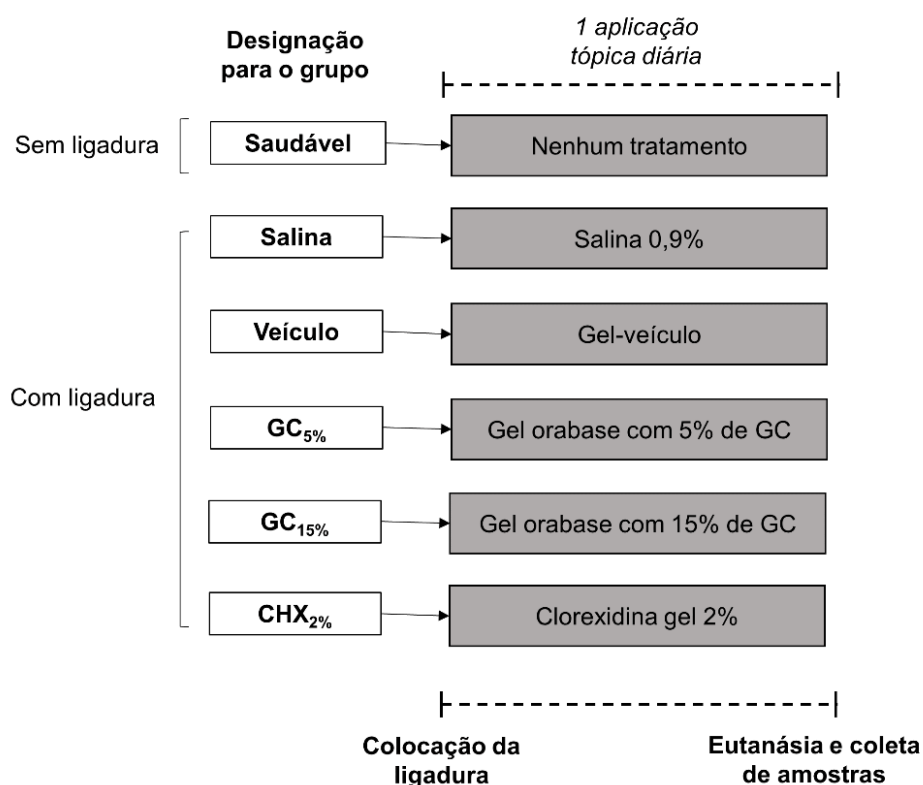
A: GC em pó (esquerda) e gel-veículo (direita); B: Mistura da GC com o gel-veículo.

4.3 INDUÇÃO DE PERIODONTITE E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a avaliar o potencial terapêutico das formulações em gel contendo GC, foi utilizado o modelo de periodontite experimental induzida por ligadura em ratos. Os animais foram obtidos do biotério da UFPI, *Campus* Petrônio Portela, todas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), de três meses de idade, pesando entre 200 e 260 g. O protocolo experimental e os métodos de manipulação animal previstos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPI (protocolo nº 229/16) (APÊNDICE). Além disso, os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Os ratos foram alojados em ambientes com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos claro-escuro de 12 horas e com disponibilidade constante de água e comida. Depois de uma semana nestas condições, os animais foram submetidos à indução de periodontite de acordo com metodologias descritas previamente (CAMPI et al., 2016; DOS SANTOS CARVALHO et al., 2017). Após anestesiados com doses intraperitoneais de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), uma ligadura de fio de *nylon* 3-0 esterilizada foi colocada ao redor do primeiro molar inferior, tomando-se o cuidado de manter o fio dentro do sulco gengival, em estreita proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó da ligadura fixado no lado mesial dos dentes. A ligadura foi mantida por um período de 20 dias, durante o qual os animais foram submetidos à diferentes tratamentos experimentais (Figura 13).

Figura 13 - Desenho experimental



Ratos foram submetidos à inserção de uma ligadura de nylon ao redor do primeiro molar inferior para induzir periodontite. A partir da colocação da ligadura (dia 1), grupos de 7 animais foram aleatoriamente escolhidos para receberem aplicações tópicas diárias durante 20 dias dos seguintes tratamentos: salina 0,9% (grupo salina), gel veículo (grupo veículo), gel orabase contendo GC a 15% (grupo GC) e clorexidina gel 2% (grupo CHX). Um grupo de 4 animais sem periodontite induzida por ligadura (grupo saudável) foi incluído como controle.

A periodontite foi induzida em um total de 35 animais, e logo após a inserção da ligadura, os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos experimentais (n = 7): (1) Salina: aplicações tópicas de solução salina 0,9%; (2) Veículo: aplicações tópicas do gel orabase utilizado como veículo (3) GC_{5%}: aplicações tópicas da formulação em gel contendo 5% da GC; (4) GC_{15%}: aplicações tópicas da formulação em gel contendo 15% da GC e (5) CHX_{2%}: aplicações tópicas de clorexidina gel 2%. Com o auxílio de um cotonete, os compostos foram administrados na região lingual e vestibular da gengiva dos primeiros molares inferiores, imediatamente após a inserção da ligadura e, posteriormente, uma vez por dia, durante os 20 dias de seguimento. Um grupo de 4 animais sem indução de periodontite foi incluído no estudo como um grupo controle (saudável). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados com doses intraperitoneais elevadas de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg).

4.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SISTÊMICOS

O peso corporal dos animais foi medido imediatamente antes do procedimento de indução da periodontite (dia 1) e antes da eutanásia dos animais (dia 20). Após a eutanásia, o peso do fígado, coração, baço e rins de cada animal também foi determinado, e amostras de 1 mL de sangue total foram coletadas a partir do plexo retro-orbital, com um tubo capilar heparinizado, e conservadas em tubos de vidro contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para testes bioquímicos e para contagem total de glóbulos brancos (MELLA et al., 2014). A avaliação de efeitos hepáticos foi realizada pela mensuração dos níveis séricos de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e a função renal pelos níveis de creatinina e ureia. Foram utilizados *kits* de dosagem bioquímica (Labtest®, Brasil), seguindo-se os protocolos recomendados pelo fabricante (Ref.: 27, 52, 53 e 127). A contagem total de glóbulos brancos foi realizada em câmaras de *Neubauer* após a adição de 20 µL de sangue total em 380 µL de solução de *Turk*. As contagens foram feitas em triplicata, e o resultado foi obtido pela média das três contagens (BERMUDEZ et al., 2016).

4.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PERIODONTAIS

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os tecidos gengivais ao redor dos dentes com a ligadura foram dissecados com lâmina de bisturi estéril (individual para cada animal) e congelados a -70°C até o processamento. A migração de neutrófilos para estes tecidos foi avaliada por meio da medida da atividade da enzima MPO. Para este teste, 50 mg de tecido gengival foram homogeneizados em tampão de potássio contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (50 mg/mL). O homogeneizado foi centrifugado em $4.000 \times g$ por 7 min a 4°C . O precipitado foi ressuspensão e a atividade da MPO medida em leitor de microplaca pela alteração na absorbância no comprimento de onda de 450 nm, usando o-dihidrocloridrato de dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. A atividade da MPO foi relatada como unidade/mg de tecido. Uma unidade da atividade da MPO foi definida como a conversão de $1 \mu\text{mol}$ de peróxido de hidrogênio em água, a 22°C , em 1 min (BRADLEY et al., 1982; CHAVES et al., 2013).

Após a coleta do tecido gengival, as mandíbulas dos animais eutanasiados também foram removidas, as quais foram separadas em lados direito e esquerdo, e fixadas em tampão de formalina a 10% com tampão fosfato durante 7 dias em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente “*overnight*”. As hemimandíbulas foram imersas em peróxido de hidrogênio (30 V) durante 7 h para facilitar a remoção mecânica do tecido mole. Por fim, foram coradas com azul de metileno a 1% (CAMPI et al., 2016; SOUZA et al., 2010), colocadas em lupa estereoscópica e fotografadas usando uma câmera digital. As imagens digitais foram submetidas à análise da perda óssea alveolar usando o software ImageJ, versão 1.47 (N.I.H., Bethesda, USA) (KUHR et al., 2004). Neste procedimento, a área (mm^2) correspondente às raízes expostas dos primeiros molares inferiores foi calculada conforme descrito anteriormente (MARTINS et al., 2016). Todas as imagens adquiridas foram comparadas com uma área conhecida ($1,0 \times 1,0 \text{ mm}^2$).

4.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MOLECULARES

Tão logo os animais foram eutanasiados, pelo menos 50 mg do tecido gengival inflamado foi imediatamente imerso na solução estabilizante *RNAlater*® (Sigma-Aldrich Co.; n° catálogo: R0901-100ML), previamente alíquotada em microtubos de 1,5 mL livres de RNase e DNase. Este reagente rapidamente penetra os tecidos e fornece proteção e estabilidade às moléculas de RNA, eliminando a necessidade de processamento tecidual imediato, ou congelamento em nitrogênio líquido. Subsequentemente, as amostras de tecido gengival foram armazenadas em freezer (-70°C) até o momento dos procedimentos de extração de RNA total.

Para a extração de RNA, as amostras de tecido gengival foram descongeladas e pesadas em balança de precisão; cerca de 50 mg de tecido foi adicionado a 1 mL do reagente *TRIzol*® (Invitrogen) e homogeneizado. Os procedimentos seguintes descrevem brevemente o protocolo recomendado pelo fabricante para extração do RNA (Invitrogen™; n° catálogo: 15596026): os homogenatos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C e o sobrenadante resultante transferido para um novo microtubo; o RNA total pôde ser isolado após a adição de clorofórmio e subsequente centrifugação; a fase aquosa, contendo apenas RNA, foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo, onde o RNA total pôde ser precipitado após a adição de isopropanol; após etapas de lavagem com álcool 75% e secagem, o RNA extraído foi dissolvido em tampão estabilizante (Invitrogen™; n° catálogo: AM7001), e armazenado em freezer (-70°C) em pequenas alíquotas, para garantir sua estabilidade e preservação, evitando-se a degradação deste material decorrente de manipulação ou de variações de temperatura.

A concentração e a qualidade do RNA extraído foram estimadas por leitura da absorbância a 260 nm (A_{260}) em espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu, Japão) e pela observação da razão A_{260}/A_{280} , respectivamente. Nesta última, considerou-se como aceitável os valores acima 1,8 como indicativo da ausência de contaminação com proteínas (ARNOLD et al., 2016). Adicionalmente, a integridade do RNA total também foi avaliada, por meio da visualização das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, após eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo tampão TBE 1x e corado com

GelRed[®] (Biotium; n° catálogo 41003). Foi considerado de boa integridade, as amostras que apresentaram bandas nítidas e com intensidades obedecendo à relação 2:1 (28S/18S).

Para cada amostra, 3 µg de RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA) com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA; n° catálogo 4368814). Cada reação foi realizada em um volume final de 60 µL, contendo água (livre de nucleases), tampão específico (1X), dNTPs (4 mM), primers randômicos (1X), inibidor de RNase (1 U/µL), transcriptase reversa *MultiScribe*[™] (2,5 U/µL), e um volume correspondente a 3 µg de RNA total. A síntese de cDNA aconteceu em um termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems, USA), com a seguinte programação: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram diluídas a 5,5 ng/µL (solução de trabalho), divididas em pequenas alíquotas, e armazenadas em freezer a -30°C.

As amostras de cDNA foram utilizadas para a análise quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR), a partir de ensaios TaqMan pré-fabricados (*TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*; Thermo Fisher Scientific). Estes ensaios incluem *primers* específicos para amplificação e sondas marcadas com fluoróforos para detecção e quantificação dos mRNA alvos sob investigação. Também foram utilizadas as misturas pré-fabricadas *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, USA; n° catálogo 4369016) com concentrações ótimas de cada um dos reagentes necessários para as reações de amplificação (dNTPs, íons Mg⁺², Taq DNA polimerase e seu respectivo tampão). Em volume final de 20 µL, as reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicatas, utilizando um total de 50 ng de cDNA por reação, e obedecendo às seguintes condições: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A fluorescência resultante de cada ciclo de amplificação foi coletada pelo equipamento *ABI 7500 Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems, USA) e registrada pelo *Sequence Detection Software* (SDS) versão 2.3 (Applied Biosystems, USA).

No total, 21 genes foram analisados (Tabela 3), dois dos quais (*GAPDH* e *ACTB*) são genes constitutivamente expressos (*housekeeping genes*), avaliados previamente como candidatos a controles endógenos. Como a

expressão relativa de *ACTB* mostrou uma maior variação entre os grupos experimentais, o *GAPDH* foi o controle endógeno escolhido para normalizar os dados de expressão de todos os genes em investigação. Além disso, todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise, sendo também normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX, para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. Todos os ensaios de qRT-PCR envolveram pelo menos dois controles negativos, para atestar ausência de contaminação da reação.

Tabela 3 – Alvos moleculares quantificados neste estudo por qRT-PCR

Nome do gene	Símbolo	TaqMan Assay*
Beta-actina	<i>ACTB</i>	Rn00667869_m1
Glicerol-3-fosfato desidrogenase	<i>GAPDH</i>	Rn01775763_g1
Interleucina1 beta	<i>IL-1β</i>	Rn00580432_m1
Interleucina 4	<i>IL-4</i>	Rn01456866_m1
Interleucina 10	<i>IL-10</i>	Rn00563409_m1
Interferon gama	<i>INFγ</i>	Rn00594078_m1
Metaloproteinase de matriz-2	<i>MMP-2</i>	Rn01538170_m1
Metaloproteinase de matriz-8	<i>MMP-8</i>	Rn00573646_m1
Metaloproteinase de matriz-9	<i>MMP-9</i>	Rn00579162_m1
Metaloproteinase de matriz-13	<i>MMP-13</i>	Rn01448194_m1
Metaloproteinase de matriz-14	<i>MMP-14</i>	Rn00579172_m1
Fator de resposta primária de diferenciação mielóide 88	<i>MYD88</i>	Rn01640049_m1
Óxido nítrico sintetase 2	<i>NOS-2</i>	Rn00561646_m1
Ciclooxigenase-2	<i>COX-2</i>	Rn01483828_m1
Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 1	<i>TIMP1</i>	Rn00587558_m1
Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz 2	<i>TIMP2</i>	Rn00573232_m1
Fator de transformação do crescimento beta	<i>TGF-β1</i>	Rn00572010_m1
Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B	<i>RANKL</i>	Rn00589289_m1
Receptor ativador do fator nuclear kappa B	<i>RANK</i>	Rn04340164_m1
Osteoprotegerina	<i>OPG</i>	Rn00563499_m1
Receptor associado ao osteoclasto	<i>OSCAR</i>	Rn01530958_m1

*www.thermofisher.com

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados de expressão gênica foram expressos em valores de C_T (*Cycle Threshold*), o qual se refere ao número ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja um determinado limiar de detecção. Os valores C_T de cada um dos genes de interesse, para cada uma das amostras, foram subtraídos dos valores C_T do controle endógeno (*GAPDH*) para obtenção de valores normalizados (ΔC_T), utilizados para a análise estatística. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Quando dentro da normalidade, foi realizada análise de variância para fator único (*one way ANOVA*) seguida do pós-teste de *Tukey*. Em casos onde não ocorreu distribuição normal, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para fins descritivos, foi utilizado o método $2\Delta\Delta C_T$ para apresentar as diferenças de expressão gênica em *fold change*. Valor $p < 0,05$ foi considerado para indicar diferenças estatisticamente significativas. Todos os protocolos e análises foram realizados de forma cega e os cálculos realizados usando o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

O processo utilizado para purificação da GC teve $80\% \pm 2,45\%$ de rendimento. O resultado da análise elementar foi negativo para a presença de nitrogênio na GC purificada, indicando ausência de proteínas contaminantes. A massa molecular da GC purificada foi estimada em $1,4 \times 10^4$ kDa.

A variância da massa corporal dos animais entre o início e o fim dos procedimentos experimentais não foi significativamente diferente entre os grupos ($p = 0,348$), como observado na Figura 14. De forma similar, as medidas de massa relativa de órgãos como o fígado, rins, baço e coração, registradas após a eutanásia dos animais (g/100 g de massa corporal), não apresentaram variância estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 4).

Figura 14 –Variação de massa corporal

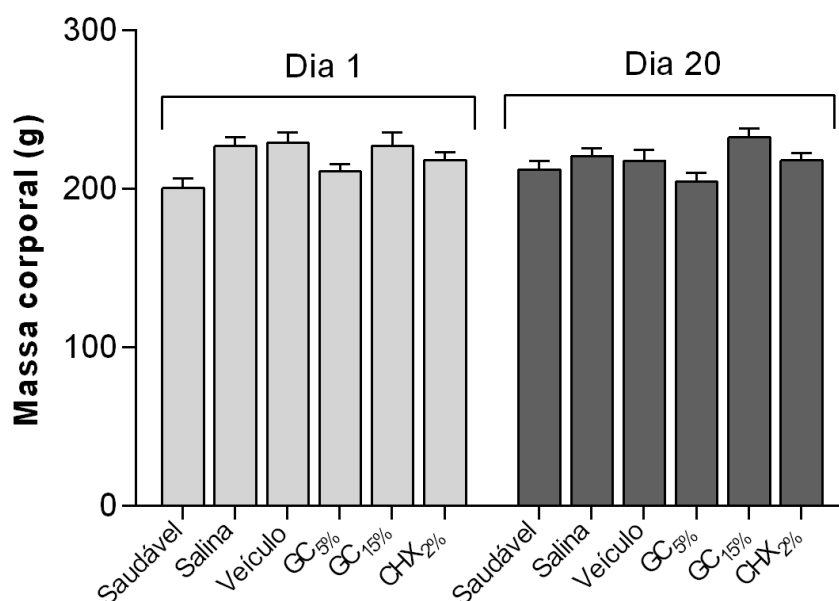


Gráfico de barras representando a massa corporal média (g) \pm EPM no início (dia 1) e final (dia 20) do período experimental. A variância dos dados nos dois períodos experimentais não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,348$; *two-way ANOVA*).

Tabela 4 - Massa relativa dos órgãos

Órgãos	Massa (g/100 g) ± DP						p*
	Saudável	Salina	Veículo	GC5%	GC15%	CHX2%	
Fígado	3,10 ± 0,24	3,01 ± 1,33	2,97 ± 0,42	3,46 ± 0,30	3,04 ± 0,24	3,12 ± 0,71	0,68
Rins	0,56 ± 0,27	0,40 ± 0,21	0,38 ± 0,04	0,50 ± 0,21	0,39 ± 0,09	0,39 ± 0,05	0,25
Baço	0,71 ± 0,06	0,72 ± 0,32	0,72 ± 0,11	0,74 ± 0,04	0,69 ± 0,04	0,74 ± 0,10	0,26
Coração	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,14	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,14

*one-way ANOVA

A Figura 15 apresenta os resultados referentes à avaliação dos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática. Os níveis séricos das transaminases hepáticas TGO e TGP não variaram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$). Os níveis séricos de creatinina e ureia também mostraram não ser influenciados significativamente por nenhuma das modalidades de tratamento empregadas no estudo ($p > 0,05$).

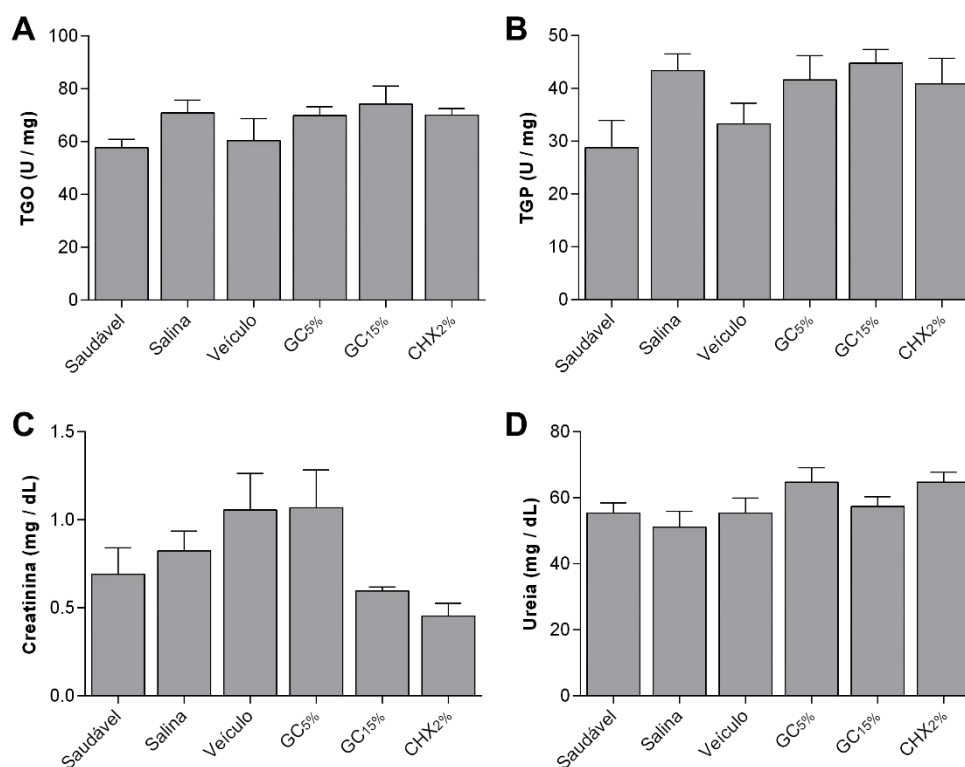
Figura 15 – Parâmetros bioquímicos sistêmicos

Gráfico de barras representando a média ± EPM dos valores da dosagem sérica de TGO (A), TGP (B), creatinina (C) e ureia (D) após a eutanásia dos ratos saudáveis e com periodontite induzida por ligadura submetidos a diferentes tratamentos. A variância dos dados não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis)

O número de leucócitos contados a partir do sangue total foi significativamente maior ($p < 0,0001$) nos animais com periodontite experimental tratados apenas com salina 0,9% ($13.028,33 \pm 3717,74$ leucócitos / μL) ou gel-veículo ($13.136,44 \pm 1.603,12$ leucócitos / μL), quando comparado aos valores apresentados pelo grupo de animais saudáveis ($5.722,45 \pm 1.122,76$ leucócitos / μL). A aplicação tópica diária das formulações em gel contendo GC, assim como o tratamento controle com clorexidina gel 2%, mostrou-se capaz de manter o número de leucócitos dos ratos com periodontite induzida por ligadura em níveis basais, já que não mostrou diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo saudável (Figura 16).

A avaliação da atividade de MPO revelou um influxo de neutrófilos significativamente maior ($p < 0,001$) nos tecidos gengivais dos ratos dos grupos salina ($51,86 \pm 17,98$ U / mg) e veículo ($54,73 \pm 17,95$ U / mg), quando comparado ao observado no grupo saudável ($16,95 \pm 3,39$ U / mg). Além disso, os grupos GC_{5%}, GC_{15%} e CHX_{2%} mostraram influxo de neutrófilos significativamente reduzidos, níveis comparáveis com os do grupo saudável (Figura 16).

Figura 16 – Parâmetros sistêmicos e locais da inflamação

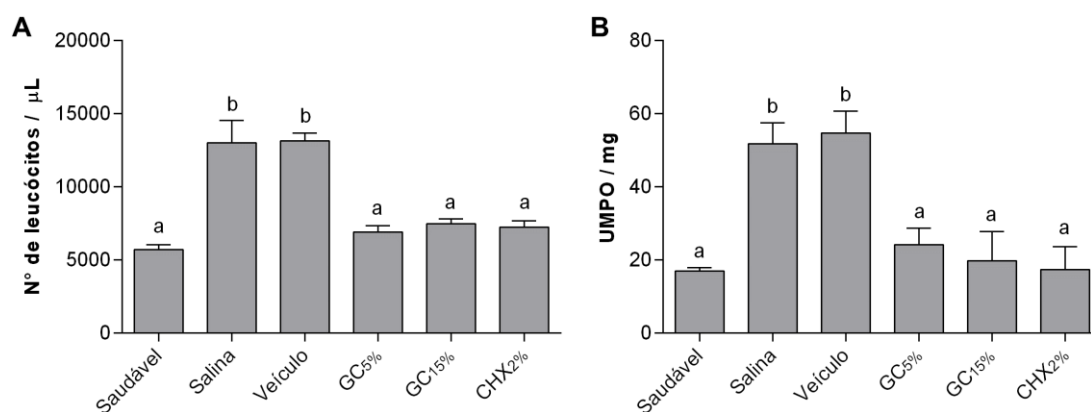


Gráfico de barras representando a média \pm EPM do número de leucócitos no sangue total (A) e a do nível de MPO nos tecidos gengivais. Letras iguais: $p > 0,05$; letras diferentes: $p < 0,05$ (one-way ANOVA (A) e Kruskal-Wallis (B)).

Em todos os ratos nos quais se colocou ligadura, foi observado extensa reabsorção óssea, independente do tratamento experimental empregado (Figura 17). No entanto, foi notado uma significativa redução da perda óssea alveolar ($p < 0,05$) no grupo GC_{15%} ($3,12 \pm 0,85$ mm²) quando comparado com os grupos

salina ($4,79 \pm 1,99 \text{ mm}^2$), veículo ($4,83 \pm 1,53 \text{ mm}^2$) ou mesmo com o grupo GC_{5%} ($4,89 \pm 1,20 \text{ mm}^2$). A inibição da reabsorção óssea observada no grupo GC_{15%} foi estatisticamente semelhante à observada no grupo CHX_{2%} ($2,64 \pm 1,12 \text{ mm}^2$, $p > 0,999$). Pelo fato de o tratamento com a formulação em gel contendo 5% de GC não ter mostrado redução significativa da perda óssea alveolar, somente o grupo GC_{15%} foi considerado para as análises de expressão gênica.

Figura 17 – Perda óssea alveolar

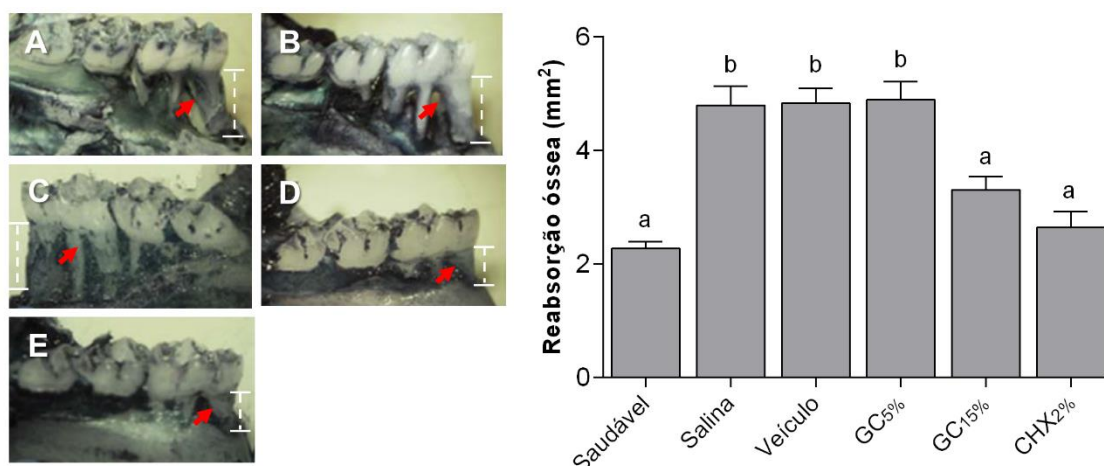
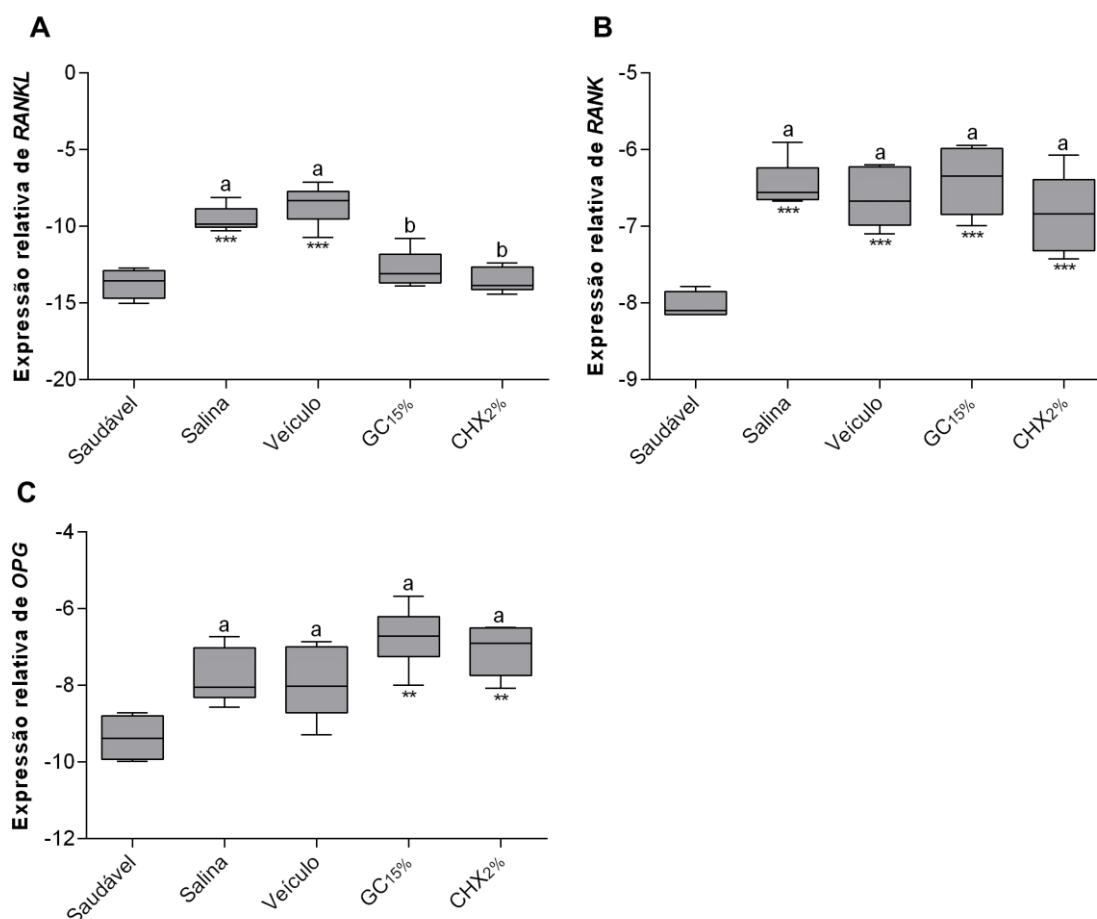


Gráfico de barras representando a média \pm EPM da perda óssea alveolar em mm^2 e registro fotográfico das mandíbulas dos grupos salina (A), veículo (B), GC_{5%} (C), GC_{15%} (D) e CHX_{2%} (E) após 20 dias de periodontite experimental. Letras iguais: $p > 0,05$; letras diferentes: $p < 0,05$ (Teste Kruskal-Wallis). Setas vermelhas indicam locais de intensa perda óssea alveolar e o tracejado branco dá uma ideia visual dessa perda.

A análise do perfil de expressão gênica nos tecidos gengivais revelou que a perda óssea alveolar foi acompanhada pela superexpressão transcricional do principal fator osteoclastogênico envolvido na patogênese da periodontite. Os níveis do mRNA de *RANKL* foram, em média, 21 vezes maiores no grupo salina do que no grupo saudável. Os tratamentos diários com aplicações tópicas de gel orabase contendo 15% da GC e clorexidina gel 2% preveniu significativamente a superexpressão de *RANKL* ($p < 0,05$). Nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, os níveis do mRNA de *RANKL* foram 88% e 94% menores, equiparando-se aos níveis observados no grupo saudável. Os níveis transcricionais de *RANK*, o receptor de *RANKL*, também aumentaram de forma estatisticamente significativa após indução da periodontite. No entanto, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados. Por outro lado, a expressão do mRNA de *OPG* no grupo saudável não foi estatisticamente diferente da observada no grupo salina. No entanto, quando comparado aos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, foi

estatisticamente maior. Em todas as situações, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos salina e veículo, bem como entre os grupos GC_{15%} e CHX_{2%}. Os resultados estão ilustrados graficamente na figura 18.

Figura 18 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores osteoclastogênicos



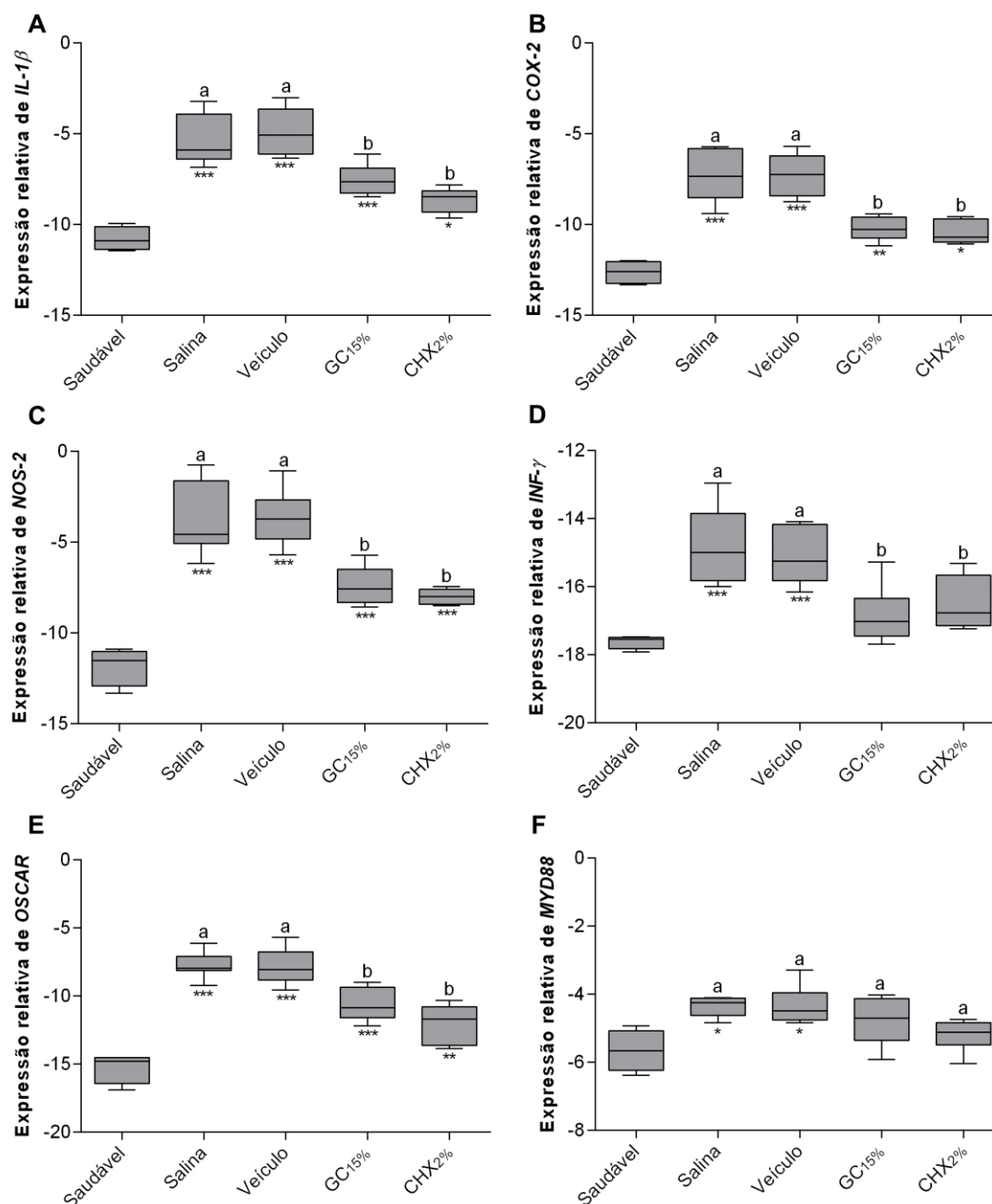
Diagramas boxplot apresentando a expressão relativa dos genes *RANKL* (A), *RANK* (B) e *OPG* (C) no tecido gengival de ratos submetidos a diferentes condições experimentais. O eixo y contém os valores de ΔC_T , ou seja, os dados de expressão gênica normalizados pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. O eixo x distingue os diferentes grupos experimentais. A linha em cada caixa é a mediana das observações; a altura da caixa representa a dispersão de 2 quartis (50% das observações); as linhas horizontais extremas representam valores superiores e inferiores. Quando indicado com as mesmas letras (a ou b), os grupos apresentam variações estatisticamente iguais e grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatísticas expressas em * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$), comparado ao grupo saudável.

A figura 19 apresenta os perfis de expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios nos tecidos gengivais submetidos às diferentes condições experimentais. A inserção da ligadura de *nylon* ao redor do primeiro molar das fêmeas de rato *Wistar* foi acompanhada por um aumento estatisticamente

significativo na expressão do mRNA dos genes *IL-1 β* , *COX-2*, *NOS-2*, *INF- γ* , *OSCAR* e *MYD88* nos tecidos gengivais afetados, conforme constatado pelas comparações entre o grupo saudável e o grupo salina ($p < 0,001$). Em nenhum dos casos houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo salina e o grupo veículo ($p > 0,05$).

O gene que codifica a citocina pró-inflamatória *IL-1 β* encontrou-se superexpresso nos grupos de animais com periodontite experimental. Os níveis do mRNA de *IL-1 β* foram 64 vezes maiores no grupo salina do que no grupo saudável. Nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, os níveis transcricionais de *IL-1 β* reduziram em 81% e 92%, respectivamente. A expressão do mRNA de *COX-2* foi 54 vezes maior no grupo salina do que no grupo saudável. A aplicação tópica de gel orabase contendo 15% da GC durante 20 dias reduziu a expressão de *COX-2* em 87%, enquanto que no grupo CHX_{2%} a expressão deste gene foi 93% menor. *NOS-2* foi o gene que apresentou os maiores níveis transcricionais na gengiva dos ratos com periodontite (550 vezes mais expresso no grupo salina quando comparado ao grupo saudável). Os valores médios de expressão do mRNA de *NOS-2* nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, no entanto, foram 95% e 98% menores, respectivamente. O gene *OSCAR* também apresentou altos níveis de expressão na periodontite induzida por ligadura. Os tecidos gengivais do grupo salina expressaram 228 vezes mais mRNA de *OSCAR* do que os tecidos saudáveis. O tratamento com gel orabase contendo 15% da GC e com clorexidina gel 2% inibiram significativamente este aumento (86% e 95%, respectivamente). A expressão relativa do mRNA de *INF- γ* foi 9 vezes maior no grupo salina do que no grupo saudável, o que diferiu de forma estatisticamente significativa do observado nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, nos quais os níveis transcricionais de *INF- γ* foram 78% e 56% menores, quando comparados ao grupo salina. A indução de periodontite por meio da inserção da ligadura também promoveu um aumento estatisticamente significativo nos níveis de mRNA de *MYD88* nos grupos salina e veículo (2,5 vezes, comparado ao grupo saudável). Os valores médios de expressão do mRNA de *MYD88* nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, no entanto, não resultou em alterações estatisticamente significativas. Em todas as ocasiões, os valores médios de expressão relativa no grupo GC_{15%} foi estatisticamente semelhante aos apresentados pelo grupo CHX_{2%}.

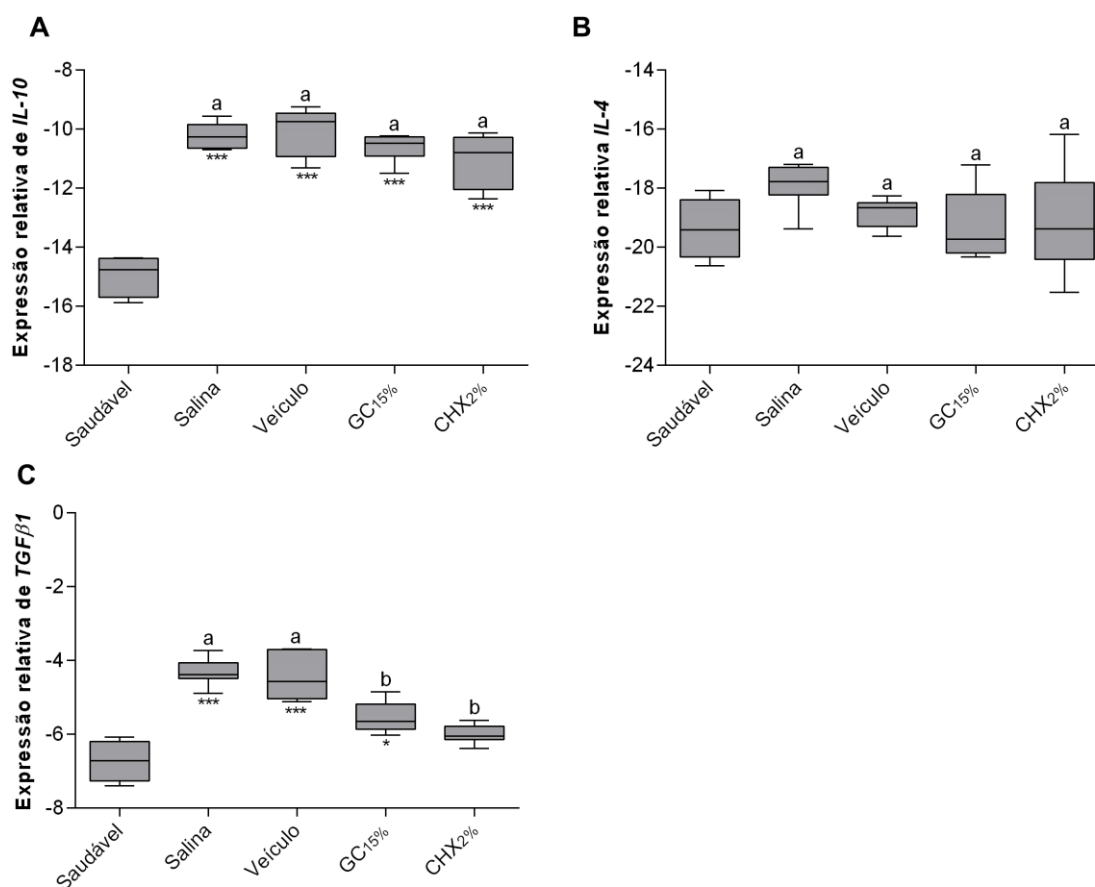
Figura 19 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores pró-inflamatórios



Diagramas boxplot apresentando a expressão relativa dos genes *IL-1 β* (A), *COX-2* (B), *NOS-2* (C), e *INF- γ* (D), *OSCAR* (E), *MYD88* (F) no tecido gengival de ratos submetidos a diferentes condições experimentais. O eixo y contém os valores de ΔC_T , ou seja, os dados de expressão gênica normalizados pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. O eixo x distingue os diferentes grupos experimentais. A linha em cada caixa é a mediana das observações; a altura da caixa representa a dispersão de 2 quartis (50% das observações); as linhas horizontais extremas representam valores superiores e inferiores. Quando indicado com as mesmas letras (a ou b), os grupos apresentam variações estatisticamente iguais e grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatísticas expressas em * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$), comparado ao grupo saudável.

Os níveis transcricionais do gene que codifica a citocina anti-inflamatória *IL-10* também aumentaram significativamente após indução da periodontite. No entanto, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados. Por outro lado, quanto aos níveis do mRNA de *IL-4*, além de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais tratados, também não se observou diferença estatística entre estes e o grupo saudável. Por fim, no tecido gengival dos grupos $GC_{15\%}$ e $CHX_{2\%}$ houve uma diminuição de 52% e 70% (respectivamente) nos níveis transcricionais de *TGF β 1* quando comparado ao grupo salina, o qual expressou 5 vezes mais do que o grupo saudável. Os resultados da análise da expressão de genes anti-inflamatórios estão ilustrados na figura 20. Importante notar que, mais uma vez, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos salina e veículo e entre os grupos $GC_{15\%}$ e $CHX_{2\%}$.

Figura 20 – Expressão gênica (mRNA) de marcadores anti-inflamatórios

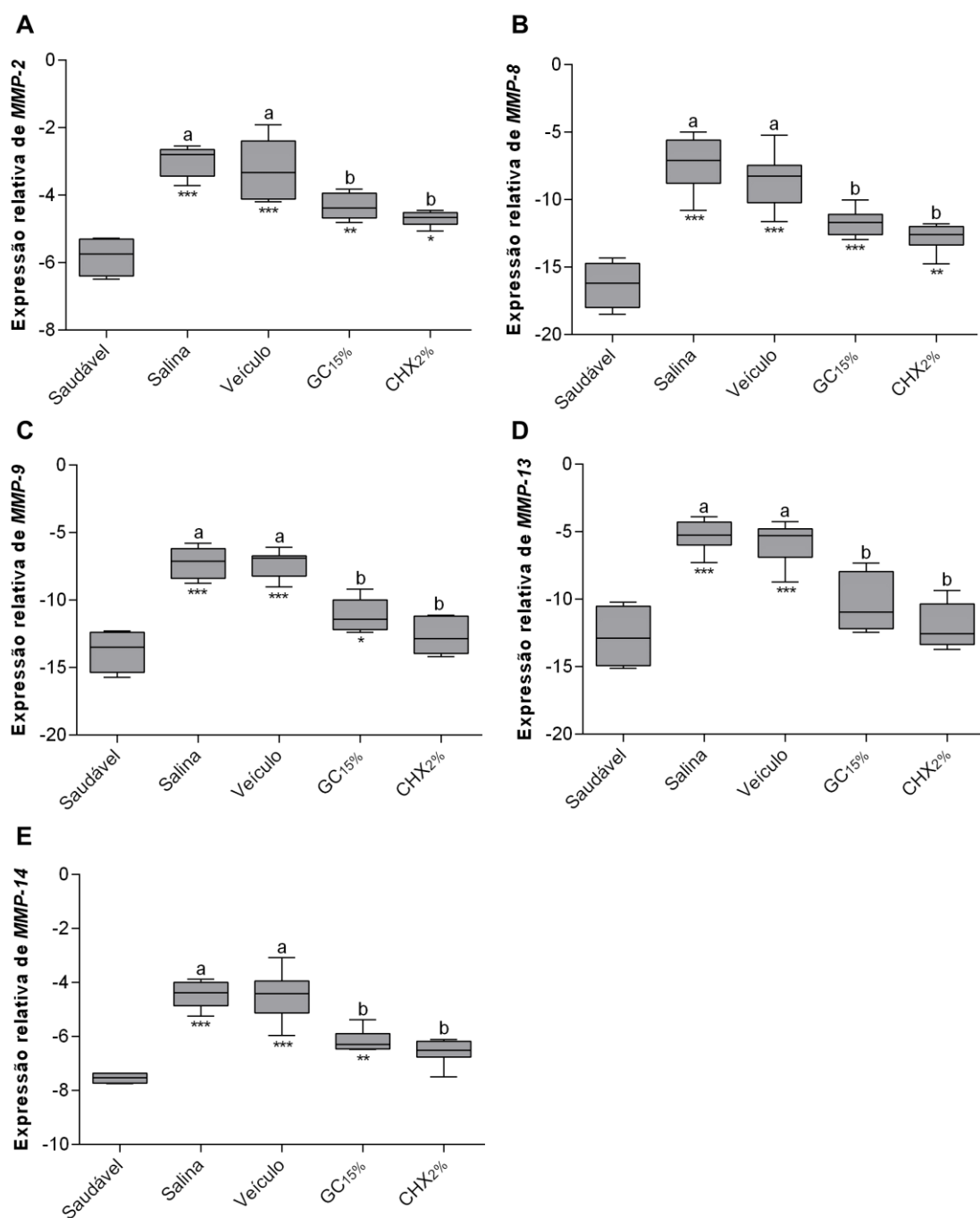


Diagramas boxplot apresentando a expressão relativa dos genes *IL-10* (A), *IL-4* (B e *TGF β 1* (C) no tecido gengival de ratos submetidos a diferentes condições experimentais. O eixo y contém os valores de ΔC_T , ou seja, os dados de expressão gênica normalizados pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. O eixo x

distingue os diferentes grupos experimentais. A linha em cada caixa é a mediana das observações; a altura da caixa representa a dispersão de 2 quartis (50% das observações); as linhas horizontais extremas representam valores superiores e inferiores. Quando indicado com as mesmas letras (a ou b), os grupos apresentam variações estatisticamente iguais e grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatísticas expressas em * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$), comparado ao grupo saudável.

A comparação global (ANOVA) dos valores médios de expressão gênica apresentado entre os grupos experimentais também revelou diferenças estatisticamente significativas para todos os genes codificadores de MMPs analisados neste estudo (Figura 21). A indução de periodontite foi acompanhada por um aumento médio de 7,5 vezes na expressão transcricional de *MMP-2*, observado pela comparação entre grupo saudável e grupo salina ($p < 0,05$). Os tratamentos com GC e clorexidina promoveram uma redução de 60% e 73% na expressão deste gene, respectivamente. *MMP-8* foi o gene com maior grau de superexpressão transcricional induzida pela periodontite. Os níveis do mRNA de *MMP-8* foram em média 885 vezes maiores no grupo salina do que no grupo saudável. As aplicações tópicas do gel orabase contendo GC e da clorexidina inibiram significativamente a superexpressão de *MMP-8* (96% e 98% mais baixa, respectivamente). De maneira similar, os grupos GC_{15%} e CHX_{2%} também apresentaram redução de 92% e 97% nos níveis de mRNA de *MMP-9*, os quais estiveram presentes 107 vezes mais nos tecidos gengivais do grupo salina do que nos tecidos saudáveis. O gene *MMP-13* também se mostrou superexpresso na periodontite, com níveis médios de mRNA cerca de 229 vezes maiores nos tecidos do grupo salina, quando comparado ao grupo saudável. Os tratamentos diários com GC e clorexidina foram suficientes para manter os níveis de expressão de *MMP-13* em seus níveis basais, visto que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudável, GC_{15%} e CHX_{2%}. Dos genes codificadores de MMPs, *MMP-14* foi o que apresentou uma elevação mais modesta na expressão do mRNA (9 vezes mais expresso no grupo salina do que no saudável). Os tratamentos com GC e clorexidina, no entanto, foram igualmente eficazes em prevenir esta superexpressão, mantendo os níveis de mRNA de *MMP-14* comparáveis aos observados nos tecidos saudáveis. Mais uma vez, em nenhum dos casos os grupos salina e veículo apresentaram divergências estatisticamente significativas, o mesmo observado entre os grupos GC_{15%} e CHX_{2%}.

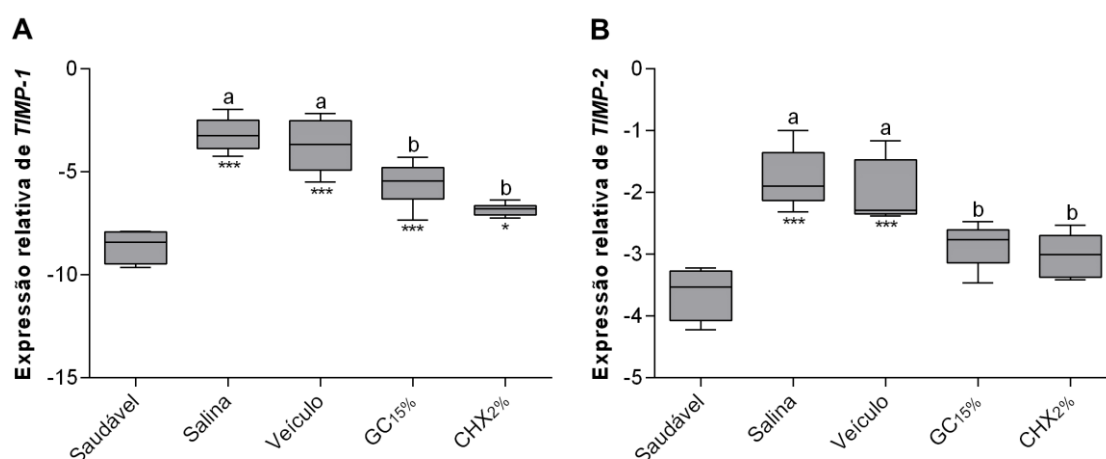
Figura 21 – Expressão de genes (mRNA) das metaloproteinases de matriz



Diagramas boxplot apresentando a expressão relativa dos genes *IL-1β* (A), *RANKL* (B), *RANK* (C) e *OPG* (D) no tecido gengival de ratos submetidos a diferentes condições experimentais. O eixo y contém os valores de ΔC_T , ou seja, os dados de expressão gênica normalizados pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. O eixo x distingue os diferentes grupos experimentais. A linha em cada caixa é a mediana das observações; a altura da caixa representa a dispersão de 2 quartis (50% das observações); as linhas horizontais extremas representam valores superiores e inferiores. Quando indicado com as mesmas letras (a ou b), os grupos apresentam variações estatisticamente iguais e grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatísticas expressas em * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$), comparado ao grupo saudável.

Em última análise, os inibidores teciduais das MMPs também apresentaram uma significativa superexpressão transcricional nos tecidos gengivais desafiados com a ligadura. *TIMP-1* esteve 50 vezes mais expresso no grupo salina do que no grupo saudável. *TIMP-2* encontrou-se mais expresso nos tecidos gengivais saudáveis quando comparado a *TIMP-1*, no entanto, seus níveis de mRNA aumentaram em apenas 3 vezes após indução da periodontite. Em ambos os casos, os níveis transcricionais destes genes foram estatisticamente menores nos grupos GC_{15%} (84% menor para o gene *TIMP-1* e 44% menor para o *TIMP-2*) e CHX_{2%} (94% menor para o gene *TIMP-1* e 59% menor para o *TIMP-2*), comparado ao grupo salina.

Figura 22 - Expressão de genes (mRNA) de inibidores de MMPs



Diagramas boxplot apresentando a expressão relativa dos genes *TIMP-1* (A) e *TIMP-2* (B) no tecido gengival de ratos submetidos a diferentes condições experimentais. O eixo y contém os valores de ΔC_T , ou seja, os dados de expressão gênica normalizados pela expressão do gene constitutivo *GAPDH*. O eixo x distingue os diferentes grupos experimentais. A linha em cada caixa é a mediana das observações; a altura da caixa representa a dispersão de 2 quartis (50% das observações); as linhas horizontais extremas representam valores superiores e inferiores. Quando indicado com as mesmas letras (a ou b), os grupos apresentam variações estatisticamente iguais e grupos com letras diferentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatísticas expressas em * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$), comparado ao grupo saudável.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS DA GC

Diferentes técnicas podem ser aplicadas para isolamento da fração polissacarídica do exsudato de *A. occidentale*. Estas podem incluir etapas de separação cromatográfica, complexação com íons metálicos e precipitação com solventes orgânicos, com rendimentos que variam de 19 a 78% (HASNAIN et al., 2018; KUMAR et al., 2009; OKOYE; ONYEKWELI; KUNLE, 2012; RODRIGUES; PAULA; COSTA, 1993). Desta forma, pode-se considerar que a técnica de purificação utilizada neste estudo, a qual envolveu precipitação com etanol, teve alto rendimento (80%).

No entanto, a técnica de purificação com etanol nem sempre é capaz de gerar um produto quimicamente puro. Silva et al. (2010) notaram presença de contaminação proteica após eletroforese da GC em SDS-PAGE, e a análise quantitativa revelou 13,5 µg de proteínas em 20 mg de GC. Embora as proteínas sejam importantes para a estabilização estrutural da GC, elas podem apresentar atividades biológicas que enviesam investigações relativas às propriedades farmacoterapêuticas da GC (SILVA et al., 2010). Neste estudo, a GC utilizada nas formulações em gel orabase não apresentou qualquer teor proteico, como mostrado pela análise elementar de nitrogênio. Por se tratar de um heteropolissacarídeo, a GC pode apresentar massa molecular variável, dependendo da fonte ou do método de extração. Diferentes estudos têm relatado massas moleculares médias que variam 1,6 a $4,39 \times 10^4$ kDa (DE PAULA; RODRIGUES, 1995; PORTO et al., 2015). A massa molecular da GC utilizada neste estudo, estimada em $1,4 \times 10^4$ kDa, portanto, não se distanciou dos valores previamente relatados na literatura.

De acordo com Araújo et al. (2012), a GC extraída e purificada da fonte utilizada neste estudo possui alto teor de galactose (59,4%), e menores quantidades de glicose (6,4%), arabinose (5,3%), ramnose (2,4%), ácido glicurônico (13,5%), entre outros resíduos de carboidratos (13%).

6.2 TOXICIDADE

Inúmeros relatos científicos têm demonstrado que *A. occidentale* possui amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, o que justifica o uso popular desta planta no tratamento caseiro de certas condições de saúde (CAMPOS et al., 2012; DA SILVEIRA VASCONCELOS et al., 2015; PAWAR et al., 2000; VANDERLINDE et al., 2009). Embora a história de *A. occidentale* na medicina popular não seja acompanhada por relatos graves de toxicidade, alguns estudos têm reportado efeitos adversos de diferentes extratos desta planta em roedores. Administrações por via oral de repetidas doses (1.000 a 14.000 mg/kg) de extratos de suas folhas, durante períodos entre 30 e 56 dias, resultaram em significativa diminuição do peso corporal dos animais, induziu danos hepáticos e renais (conforme indicado pelos níveis séricos das transaminases hepáticas, creatinina e ureia, assim como pela massa relativa do fígado e dos rins), e aumentou a contagem total de glóbulos brancos (KONAN et al., 2007; TÉDONG et al., 2006). Uma única dose do extrato da casca do caule do cajueiro (5.000 mg/kg) provocou morte em ratos uma hora após a administração oral. No mesmo estudo, houve evidências de hepatotoxicidade após administrações repetidas de até 2.870 mg/kg durante duas semanas (OKONKWO et al., 2010).

Gomas naturais se destacam por sua baixa toxicidade, e a GC parece não ser uma exceção. A administração intragástrica de doses de até 5.000 mg/kg de GC não provocou nenhum efeito adverso em coelhos (OKOYE; ONYEKWELI; KUNLE, 2012). Em ratos, administrações orais de 250 mg/kg de GC durante 30 dias não teve impacto sobre o ganho de massa corporal ou sobre parâmetros hematológicos. Além disso, aplicações tópicas de GC em gel não provocou quaisquer reações dermatológicas em modelo animal (KUMAR et al., 2009). Estudos *in vitro* que testaram a viabilidade celular em meios contendo GC revelaram baixa citotoxicidade nas concentrações testadas, inclusive em linhagens de queratinócitos e fibroblastos (QUELEMES et al., 2017; YAMASSAKI et al., 2015), indicando que a aplicação tópica da GC é relativamente segura.

Informações a respeito da influência da GC sobre a função renal e hepática são escassas na literatura. No presente estudo, a análise dos níveis

séricos de marcadores bioquímicos não indicou evidências de toxicidade hepática ou renal em ratos com periodontite tratados topicamente com formulações em gel orabase contendo diferentes concentrações da GC (Figura 15). Fígado e rins foram pesados após o período de tratamento, e nenhuma variação significativa na massa desses órgãos (relativo à massa corporal) foi notada entre os grupos, assim como para outros órgãos, como baço e coração (Tabela 4). A massa corporal também tem sido um parâmetro utilizado para avaliar a toxicidade sistêmica de fitofármacos (KONAN et al., 2007; TÉDONG et al., 2006). Neste estudo, a indução de periodontite não ocasionou em perdas ou ganhos estatisticamente significativos de massa corporal, e o tratamento com GC não promoveu alterações neste cenário (Figura 14). Juntos, estes dados sugerem que o uso tópico da GC nas concentrações testadas não promoveu efeitos adversos sistêmicos.

6.3 INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo que compõem o sistema de implantação e suporte dos dentes na cavidade oral. Esta doença é considerada um grave problema de saúde pública, pois não apenas representa a principal causa de perda dentária em adultos, como também é um forte fator de risco para doenças sistêmicas de elevada morbimortalidade, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Os processos imuno-inflamatórios que acompanham o desenvolvimento e progressão da periodontite são dirigidos por estímulos infecciosos provenientes do biofilme subgengival. Na incapacidade de eliminar a ameaça microbiana, tais processos comprometem significativamente a homeostase e integridade dos tecidos periodontais. O modelo animal de periodontite utilizado neste estudo (modelo de ligadura em ratos) compreende uma técnica simples de indução da doença, porém padronizada e confiável. Este modelo é caracterizado pelo progressivo acúmulo de biofilme bacteriano na ligadura, com conseqüente aumento de infiltrado inflamatório e rápida destruição dos tecidos moles e mineralizados do periodonto (STRUILLOU et al., 2010).

A extensão da inflamação nos tecidos gengivais pode ser avaliada pelo influxo de células inflamatórias granulocíticas, confirmado indiretamente pela atividade de enzimas secretadas particularmente por estas células. Neutrófilos estão massivamente presentes nos sítios de infecção em todas as fases do processo inflamatório instaurado no periodonto e contribuem significativamente para a patogênese da periodontite (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016). Quando ativados, passam a consumir quantidades maiores de oxigênio, num processo conhecido como “explosão respiratória”, o qual resulta na produção de espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio. A partir deste composto, a enzima MPO, a proteína mais abundantemente presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, produz ácido hipocloroso, substância citotóxica utilizada para matar bactérias e outros patógenos (SCOTT; KRAUSS, 2011). MPO tem sido um biomarcador amplamente utilizado para a avaliação do estado inflamatório dos tecidos periodontais, pois apresenta forte correlação com a progressão clínica da periodontite e com a resposta ao tratamento (DAGAR et al., 2015; GOMES et al., 2009).

Neste estudo, o sucesso da indução de periodontite após inserção da ligadura nos ratos pôde ser comprovado pelo aumento significativo dos níveis teciduais de MPO e da perda óssea alveolar no grupo salina, comparado ao grupo de animais sem ligadura (Figuras 16 e 17). Para ambos os parâmetros, a aplicação tópica do gel orabase utilizado como veículo para a preparação das formulações contendo GC produziu resultados comparáveis à salina ($p > 0,05$), confirmando a inerticidade do veículo empregado. Os grupos GC_{5%} e GC_{15%} apresentaram níveis médios de MPO 55% e 63% menores (respectivamente) quando comparados aos grupos salina e veículo ($p < 0,05$). O mesmo foi observado no grupo CHX_{2%}, no qual se observou redução de cerca de 67% do infiltrado inflamatório. O efeito anti-inflamatório apresentado pela clorexidina pode ser considerado uma consequência indireta de sua ação bactericida (VAN LEEUWEN; SLOT; VAN DER WEIJDEN, 2011). Outros estudos já demonstraram o efeito inibitório da clorexidina e de outros agentes antimicrobianos sobre a migração de leucócitos para os tecidos gengivais de ratos, acompanhando a redução na carga bacteriana local (BOTELHO et al., 2007; TROMBONE et al., 2010). A clorexidina, assim como as formulações em gel contendo GC desenvolvidas neste estudo, também reduziram a contagem

total de leucócitos circulantes a números estatisticamente semelhantes ao observado no grupo saudável, indicando que o tratamento com estes compostos também reduz a inflamação a nível sistêmico.

Uma certa cautela deve ser tomada ao considerar o efeito anti-inflamatório da GC uma consequência de sua atividade antimicrobiana. Embora esta atividade já tenha sido demonstrada em estudos *in vitro* (CAMPOS et al., 2012; QUELEMES et al., 2017), indicando inclusive um mecanismo de ação semelhante ao da clorexidina (rompimento de membrana celular), outros estudos (também *in vitro*) sugerem ausência de efeito antimicrobiano para a GC (QUELEMES et al., 2013; TORQUATO et al., 2004). Esta discrepância pode estar relacionada às diferentes concentrações da GC utilizadas nestes estudos ou à variações no processo de purificação empregado (MARQUES; ALBUQUERQUE; XAVIER-FILHO, 1992; TORQUATO et al., 2004). Além disso, nenhum destes estudos incluiu bactérias periodontopatogênicas. Alguns estudos com ratos mostraram evidências do efeito anti-inflamatório da GC em contextos não infecciosos, seja baseado nos níveis de MPO (CARVALHO et al., 2015), seja baseado em características clínicas (SCHIRATO et al., 2006), o que sugere que este polissacarídeo pode modular a inflamação por outras vias.

6.4 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Os eventos inflamatórios que sucedem à invasão microbiana no periodonto promovem um desequilíbrio do processo de remodelamento ósseo local em favor da atividade destrutiva dos osteoclastos, gradualmente levando à destruição do osso alveolar, considerado a principal marca da periodontite (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). Neste estudo, a constante presença da ligadura ao redor dos molares dos animais durante os 20 dias de tratamento experimental promoveu uma severa perda óssea alveolar em todos os grupos experimentais (Figura 17). No entanto, a reabsorção óssea observada nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} foi estatisticamente menor (35 e 45%, respectivamente), comparada com os grupos salina, veículo e GC_{5%}. Estes resultados sugerem que o efeito protetor da GC pode ser dose-dependente, conforme também evidenciado por Carvalho et al. (2015) ao estudarem o efeito gastroprotetor da GC contra lesões induzidas por naproxeno.

A GC tem sido muito utilizada como um eficiente excipiente farmacêutico. Este polímero natural pode ser usado como veículo no preparo de formulações tópicas em gel contendo anti-inflamatórios, anestésicos, entre outros compostos usados na clínica odontológica (DAS; NAYAK; NANDA, 2013; HASNAIN et al., 2018; KUMAR et al., 2009). Este é o primeiro estudo *in vivo* a demonstrar evidências do efeito protetor direto de aplicações tópicas de GC em gel orabase sobre o periodonto. Outros polissacarídeos naturais também têm mostrado atenuar a perda óssea alveolar em modelos de periodontite induzida em animais, a exemplo dos β -glucanos, extraídos de diferentes cogumelos medicinais (KIM et al., 2012; SILVA et al., 2015b). Além disso, um ensaio clínico revelou que o uso tópico de formulações em gel contendo goma arábica (*Acacia arabica*), um arabinogalactano, foi capaz de melhorar os parâmetros clínicos em pacientes com periodontite crônica, em complemento aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (SINGHAL et al., 2018). Os resultados apresentados no presente estudo, portanto, abrem perspectivas para o uso de formulações tópicas contendo GC no tratamento adjuvante da periodontite. Para melhor analisar o contexto molecular dos tecidos periodontais sujeitos à inflamação e à intervenção terapêutica com a concentração de GC que melhor preveniu a perda óssea alveolar (15%), foram examinados neste estudo os níveis transcricionais de diferentes mediadores que ajudam a promover ou a retardar os danos periodontais promovidos pelo biofilme subgengival.

Reabsorção óssea pode ser induzida por diversos fatores, os quais governam o número e a atividade dos osteoclastos. Em nível celular, o principal sinal necessário para desencadear a diferenciação e ativação dos osteoclastos é representado pela ligação de RANKL, expresso principalmente na superfície de osteoblastos, a seu receptor RANK presente na membrana celular de células progenitoras de osteoclastos (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Esta ligação engrena vias de sinalização intracelular que ativam diferentes fatores de transcrição. Estes, por sua vez, se translocam para o núcleo das células, onde irão regular a expressão de vários genes específicos de osteoclastos. O processo de osteoclastogênese, no entanto, é contrabalanceado pela proteína solúvel OPG, que também é capaz de ligar RANKL, neutralizando-o. OPG é secretado por osteoblastos, e sua expressão nestas células é regulada pela maioria dos fatores que induzem a expressão da proteína RANKL. Durante

a diferenciação dos osteoclastos, o aumento da expressão de RANKL é acompanhado pela redução da expressão de OPG, fazendo com que o aumento da proporção RANKL/OPG favoreça a osteoclastogênese (GRAVES; LI; COCHRAN, 2011).

Perturbações no sistema RANK/RANKL/OPG são consideradas o elemento central da periodontite (SOJOD et al., 2017). A expressão de RANKL geralmente encontra-se elevada nos tecidos gengivais, fluido crevicular gengival e saliva de pacientes com a doença, e os níveis de OPG permanecem inalterados ou reduzidos. Portanto, a proporção RANKL/OPG é significativamente maior nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite do que a observada em condições saudáveis (BALTACIOĞLU et al., 2014; BELIBASAKIS et al., 2011; HASSAN et al., 2015). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com estas observações. A indução de periodontite em ratos aumentou de forma estatisticamente significativa os níveis transcricionais de *RANK* e *RANKL*, enquanto que os níveis do mRNA de *OPG* não sofreram alterações significativas (Figura 18). A aplicação tópica da formulação em gel contendo 15% da GC preveniu elevações significativas na expressão do mRNA de *RANKL*, o mesmo sendo observado no grupo CHX_{2%}. Além disso, houve um leve, porém estatisticamente significativo, aumento nos níveis transcricionais de *OPG* nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} quando comparado com o grupo saudável. As quantidades de mRNA de *RANK*, no entanto, permaneceram estatisticamente inalteradas entre os grupos experimentais. Portanto, a redução na perda óssea alveolar observada nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} pode ser explicada pela redução da proporção *RANKL/OPG* nos tecidos gengivais dos animais tratados.

Os resultados apresentados nas subseções 6.1 a 6.4 compuseram o artigo intitulado “*Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis*” (SOUZA FILHO et al., 2018).

6.5 GENES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO

A expressão do gene *RANKL* pode ser induzida por diferentes fatores, como hormônios, prostaglandinas e citocinas inflamatórias. Dentro desta última

categoria de moléculas, a citocina IL-1 β pode ser considerada o mais potente mediador da reabsorção óssea via regulação positiva da expressão de *RANKL*. No contexto da inflamação, a prostaglandina E2 (PGE2) também é capaz de estimular osteoblastos a aumentarem a produção de *RANKL*, assim como a reduzirem a secreção de OPG (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2018). Esta prostaglandina é derivada do metabolismo do ácido araquidônico, e sua biossíntese em tecidos inflamados é principalmente dirigida pela enzima COX-2. Drogas que inibem seletivamente a ação desta enzima têm demonstrado reduzir a inflamação gengival e a perda óssea alveolar. IL-1 β e COX-2 são peças essenciais para o início e regulação das respostas imunes contra infecções no periodonto, no entanto, seus níveis de expressão são diretamente proporcionais à severidade dos danos inflamatórios aos tecidos, incluindo a perda óssea alveolar (HUSSAIN et al., 2016; REHER et al., 2007).

Diferentes modalidades de tratamento periodontal têm sido associadas a reduções significativas na expressão de IL-1 β e COX-2, tanto em nível de mRNA quanto em nível proteico (FURLANETO et al., 2018; REDDY et al., 2013; SATTARI et al., 2011). Neste estudo, os tecidos gengivais de ratos com periodontite induzida por ligadura superexpressaram mRNA de *IL-1 β* e *COX-2*, quando comparado aos tecidos gengivais saudáveis ($p < 0,05$). O tratamento tópico com gel orabase contendo 15% da GC foi eficaz em reduzir os níveis transcricionais desses mediadores, de forma semelhante à clorexidina. Dessa forma, a prevenção da perda óssea alveolar promovida por estes compostos envolveu a redução de mediadores pró-inflamatórios importantes para a ativação dos osteoclastos, o que corrobora com os resultados relacionados à expressão do mRNA de *RANKL*.

O papel de mediadores inflamatórios gasosos na destruição do periodonto também tem sido bastante documentado, sendo o NO seu melhor representante. O NO regula vários processos fisiológicos importantes, incluindo o recrutamento de leucócitos durante processos inflamatórios. Sua superexpressão nos tecidos periodontais durante as primeiras fases das respostas imuno-inflamatórias é uma importante estratégia de combate às bactérias invasoras. No entanto, na cronificação destas respostas, os níveis aumentados de NO podem ser tornar patológicos, contribuindo para a degradação dos tecidos colagenosos e mineralizados do periodonto. O NO é sintetizado por diferentes isoformas da

enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Nos tecidos inflamados do periodonto, a isoforma NOS-2, ativada por estímulos pró-inflamatórios, produz quantidades significantes de NO. O NO salivar tem sido sugerido como um bom indicador do *status* inflamatório do periodonto (SCAREL-CAMINAGA et al., 2017), e resultados de uma meta-análise sugerem que pacientes com periodontite apresentam níveis sanguíneos significativamente mais altos de NO do que controles saudáveis (LIU et al., 2014). Além disso, tem sido demonstrado que o NO produzido por NOS-2 intensifica a perda óssea alveolar ao estimular a diferenciação osteoclástica induzida por RANKL (NI et al., 2016a). No modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos utilizado neste estudo foi observado níveis transcricionais significativamente elevados do gene *NOS-2*. Outros estudos com este modelo também observaram esta superexpressão em nível proteico (NI et al., 2016a). Nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, a expressão de *NOS-2* foi estatisticamente mais baixa do que a observada nos grupos salina e veículo, o que reforça o papel patogênico do NO na periodontite crônica.

A produção e atividade de mediadores pró-inflamatórios é modulada por uma rede de citocinas regulatórias, secretadas por diferentes subtipos de células T, designados de linfócitos T *helper* (Th). O INF- γ , por exemplo, é um representante importante das citocinas produzidas pelo subtipo Th1, que regulam positivamente a inflamação. As citocinas produzidas pelos subtipos Th2 tais como IL-4 e IL-10, por outro lado, apresentam ação antiinflamatória. De acordo com a análise transcricional quantitativa realizada neste estudo, a citocina IL-4 parece não participar significativamente da regulação antiinflamatória no periodonto de ratos desafiados com ligadura, como também indicado por estudos utilizando amostras periodontais humanas (GORSKA et al., 2003; PAPATHANASIOU et al., 2014). Por outro lado, os níveis do mRNA de *IL-10* aumentaram de maneira estatisticamente significativa após inserção e permanência de ligadura durante 20 dias, indicando a existência de um esforço do hospedeiro em frear a inflamação periodontal e os danos por ela promovidos. Camundongos com deficiência congênita de IL-10 demonstraram alta susceptibilidade à perda óssea alveolar induzida por *Porphyromonas gingivalis* (SASAKI et al., 2004). Estudos *in vitro* indicam que IL-10 é capaz de induzir a expressão de OPG e inibir a produção de RANKL por fibroblastos do ligamento periodontal (ZHANG et al., 2016). Neste estudo, aplicações tópicas de GC e

clorexidina não influenciaram os níveis de mRNA de *IL-4* e *IL-10*, sugerindo que o efeito protetor destes compostos se baseia na regulação negativa de mediadores pró-inflamatórios mais do que na indução da expressão de citocinas anti-inflamatórias.

Reforçando esta hipótese, foi notado neste estudo que o nível transcricional de *INF-γ* foi significativamente mais baixo nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} quando comparado com os grupos salina e veículo. Assim como observado neste estudo, diferentes métodos de indução de periodontite em ratos têm demonstrado elevações significativas na expressão de *INF-γ* nos tecidos gengivais desafiados, tanto em nível de mRNA quanto proteico (GARLET et al., 2006; LEE et al., 2017; QUEIROZ et al., 2010), o que corrobora com observações em amostras clínicas de pacientes com periodontite (GORSKA et al., 2003; PAPATHANASIOU et al., 2014). Queiroz et al. (2010) testaram o efeito de polissacarídeo extraído de *Caripia montagnei* (glucano) em camundongos com periodontite induzida por tioglicolato e notaram reduções nos níveis gengivais de *INF-γ*, semelhantemente ao observado com o polissacarídeo de *A. occidentale* testado no presente estudo. Entretanto, no estudo de Queiroz et al. (2010) também foi relatado um aumento significativo nos níveis de *IL-10*, o que indica que polissacarídeos naturais podem atuar diferencialmente sobre diferentes aspectos da inflamação.

No presente estudo, o perfil de expressão de *TGFβ1* também foi avaliado. Esta citocina regula diferentes processos fisiológicos, tais como proliferação, diferenciação e morte celular, assim como apresenta papel importante na modulação das respostas inflamatórias. Neste último contexto, *TGFβ1* pode apresentar um efeito dual: ao mesmo tempo em que estimula o aumento do infiltrado celular nos tecidos comprometidos e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias destrutivas, é considerado um mediador essencial do processo de reparo tecidual, agindo sobretudo em favor da síntese de matriz extracelular (GÜRKAN et al., 2006). Relatos de que *TGFβ1* está superexpresso nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite (GÜRKAN et al., 2006; KHALAF; LÖNN; BENGTTSSON, 2014; MIZE et al., 2015) sugerem que esta citocina é um dos componentes que contribui para a extensão dos danos causados pela resposta inflamatória.

Outra linha de pensamento, por outro lado, defende que os altos níveis de expressão de *TGFβ1* na periodontite representa um mecanismo para mitigar os efeitos destrutivos da inflamação. Estudos clínicos têm demonstrado que logo após o início do tratamento periodontal ocorre aumentos expressivos nos níveis teciduais de *TGFβ1*, seguido de um substancial declínio (GÜRKAN et al., 2008; KURU et al., 2004; VIKRAM et al., 2015). Estes resultados sugerem que o aumento na expressão de *TGFβ1* representa um esforço fisiológico visando acelerar a recuperação do periodonto. Em linha com estas observações, observou-se no presente estudo que os níveis transcricionais de *TGFβ1* estavam significativamente elevados 20 dias após a indução da periodontite em ratos. Nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, no entanto, notou-se um declínio estatisticamente significativo na expressão transcricional dessa citocina. Apesar de a análise quantitativa desta expressão não ter sido avaliada em função do tempo de tratamento, pode-se sugerir que a redução nos níveis do mRNA de *TGFβ1* observada pode ser uma consequência da minimização dos danos teciduais promovida pela redução de mediadores pró-inflamatórios.

Este estudo representa o primeiro registro da expressão relativa do mRNA do gene *OSCAR* em tecidos gengivais de ratos com periodontite. O produto deste gene é um receptor estruturalmente semelhante às imunoglobulinas e é principalmente conhecido como um fator coestimulatório do processo de reabsorção óssea. No entanto, este receptor, que está expresso em todas as células imunes da linhagem mieloide em humanos, também tem demonstrado antagonizar a ativação de cascatas pró-inflamatórias que medeiam o início das respostas imunes, e tem sido implicado na patogênese de doenças humanas, como a artrite reumatoide (NEMETH et al., 2011; SCHULTZ et al., 2016). Depois de *NOS-2*, os níveis do mRNA gengival de *OSCAR* foram os que mais se elevaram após indução da periodontite (aumento de mais de 200 vezes). A expressão de *OSCAR*, no entanto, foi significativamente menor nos grupos GC_{15%} (86%) e CHX_{2%} (95%). Estes resultados incentivam a exploração de *OSCAR* como possível biomarcador para a periodontite ou como alvo molecular de tratamentos farmacológicos.

A ativação dos fatores transcricionais que dirigem a expressão de genes pró-inflamatórios nas respostas contra infecções é precedida por uma cascata de eventos citoplasmáticos que se iniciam após o reconhecimento de antígenos

microbianos. No periodonto, os TLRs são a principal classe de receptores celulares responsável por reconhecer padrões moleculares estranhos ao hospedeiro (PAMPs). Esta família de receptores é composta atualmente por 10 membros (TLR1-10), os quais são expressos por células periodontais e por células do sistema imunológico. Cada membro reconhece tipos particulares de PAMPs (LPS, proteoglicanos, ácidos nucleicos etc.) e podem ativar vias de sinalização intracelular distintas, as quais resultam ultimamente na produção de diferentes conjuntos de citocinas efetoras. A maioria dessas vias, no entanto, depende da molécula adaptadora MYD88 para que a ligação TLR-PAMP sinalize eficientemente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (CEKICI et al., 2014).

Vários estudos têm revelado que MYD88 está constantemente expresso em altos níveis nos tecidos gengivais saudáveis (DELITTO et al., 2018; GHADERI et al., 2014; MOCHIZUKI et al., 2004), o que também foi observado no presente estudo. Estas observações podem ser justificadas pelo contínuo estímulo desempenhado por microrganismos comensais da cavidade oral, e sugerem que MYD88 é parte central no controle da homeostase periodontal (DELITTO et al., 2018). Além disso, estudos em camundongos com deficiência de *MYD88* demonstram que vias de sinalização por ele mediadas são essenciais para a regulação do eixo RANK/RANKL/OPG, portanto, para o metabolismo ósseo fisiológico. Sua superexpressão tem sido correlacionada com perda óssea alveolar em roedores (ENDO et al., 2013; LIN et al., 2017). Corroborando com estas observações, o presente estudo revelou um aumento estatisticamente significativo nos níveis transcricionais de *MYD88* após indução de periodontite em ratos, semelhante aos resultados obtidos a partir de tecidos gengivais humanos (GHADERI et al., 2014). Nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%}, no entanto, os níveis transcricionais de *MYD88* foram estatisticamente semelhantes aos dos grupos salina e veículo. Um estudo utilizando modelos de periodontite em camundongos demonstrou que o aumento na perda óssea alveolar e na produção de citocinas inflamatórias induzidas por ligadura não dependeu da sinalização de TLRs, ao contrário do observado em modelo de periodontite induzida por LPS (LIN et al., 2017). Estes resultados sugerem a existência de vias independentes de TLR, capazes de regular a perda óssea e a inflamação em modelo de periodontite induzida por ligadura.

Os resultados apresentados nessa subseção compuseram o manuscrito intitulado “*Topical application of cashew gum or chlorhexidine gel reduces overexpression of proinflammatory genes in experimental periodontitis*”, submetido à apreciação para publicação no *International Journal of Biological Macromolecules* (ISSN: 0141-8130) em 12 de novembro de 2018.

6.6 GENES RELACIONADOS À MATRIZ EXTRACELULAR

O presente estudo também se propôs analisar os níveis transcricionais de enzimas proteolíticas diretamente envolvidas na degradação da matriz extracelular de vários tecidos, incluindo o osso, coletivamente chamadas de MMPs. Estas enzimas são categorizadas em colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, and MMP-18), gelatinases (MMP-2 and MMP-9), estromelisinases (MMP-3 and MMP-10) e MMPs de membrana (MMPs 14–17), dependendo da sua estrutura e da especificidade de substrato. No periodonto, estas enzimas são fisiologicamente importantes para o processo de remodelamento tecidual e são principalmente secretadas por fibroblastos (FRANCO et al., 2017). No entanto, suas expressões podem ser potencializadas por citocinas pró-inflamatórias, e a ação destas enzimas sobre a matriz extracelular passa a ter consequências patológicas. A atividade das MMPs, no entanto, pode ser atenuada por inibidores endógenos específicos conhecidos como TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases). A destruição periodontal promovida pelas MMPs é, em parte, o resultado de um desequilíbrio entre MMPs e TIMPs (VARDAR-SENGUL et al., 2008).

Considerando que o colágeno do tipo I é o principal componente da matriz extracelular periodontal, uma maior atenção tem sido voltada para as colagenases (particularmente MMP-8 e MMP-13) e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em estudos sobre a patogênese da periodontite. Além disso, tem sido demonstrado que osteoblastos expressam vários tipos de MMPs, incluindo MMP-2, -3, -9, -13 e -14, as quais parecem ser essenciais para o processo de reabsorção óssea (FRANCO et al., 2017). Inúmeros estudos, revisados por Sapna et al. (2013), apresentam amplas evidências de que a concentração destas enzimas em fluidos orais e tecidos gengivais de pacientes com periodontite é significativamente maior do que a observada em indivíduos

saudáveis. Os níveis destas enzimas também estão correlacionados proporcionalmente à severidade da doença, declinando após intervenções terapêuticas (NI et al., 2016b).

Os resultados do presente estudo reforçam a importância das MMPs na patogênese periodontal, uma vez que a indução de periodontite em ratos por meio da inserção de uma ligadura de *nylon* ao redor dos primeiros molares foi acompanhada pelo aumento estatisticamente significativo dos níveis de mRNA de todas as MMPs investigadas (MMP-2, -3, -8, -9 e -14). Outros estudos utilizando este modelo animal obtiveram os mesmos resultados por meio de outras técnicas de análise (*western blot* e imunohistoquímica) (DONG; HUIHUI; LI, 2015; NI et al., 2016a; VARDAR-SENGUL et al., 2008). Neste estudo, aplicações tópicas do gel orabase contendo GC ou clorexidina foram eficazes em reduzir significativamente os níveis de expressão deste conjunto particular de MMPs.

Ao contrário do observado com as MMPs, cuja superexpressão na periodontite parece ser um consenso na literatura, resultados a respeito da expressão de seus inibidores naturais no contexto da inflamação periodontal são contraditórios. Vários estudos comparando os níveis proteicos de TIMPs no fluido crevicular gengival ou saliva de pacientes periodontais com os de indivíduos saudáveis têm apresentado níveis significativamente reduzidos destes inibidores na doença periodontal. Além disso, estes estudos clínicos revelam que a concentração de TIMPs diminui proporcionalmente com a progressão da doença e aumenta após realização de raspagem e alisamento radicular (NI et al., 2016b; P POPAT; BHAVSAR; POPAT, 2014; REDDY et al., 2014, 2013). Por outro lado, resultados inversos ou sem diferença estatisticamente significativa têm sido relatados, tanto em estudos clínicos como em modelos animais (GARLET et al., 2004; KUBOTA et al., 2008; NI et al., 2016b).

No presente estudo, a expressão de dois genes pertencentes à família TIMP (*TIMP-1* e *TIMP-2*) foi analisada por qRT-PCR. O produto destes genes age inespecificamente sobre a maioria das MMPs já identificadas (FRANCO et al., 2017). Foi observado que ambos os genes estiveram constitutivamente expressos nos tecidos gengivais saudáveis, e que esta expressão aumentou significativamente nos grupos de animais nos quais a periodontite foi induzida,

corroborando com os resultados de Garlet et al. (2006). Este aumento pode refletir uma tentativa de manutenção da homeostase tecidual, face à elevada expressão de MMPs nos tecidos periodontais inflamados (GARLET et al., 2004). No entanto, esta tentativa parece ser insuficiente para contrabalancear a superexpressão de MMPs e impedir a destruição periodontal. Os níveis transcricionais de *TIMP-1* e *TIMP-2* foram estatisticamente menores nos grupos GC_{15%} e CHX_{2%} comparados aos grupos salina e veículo. Pode-se sugerir, portanto, que as reduções significativas de MMPs observadas após o tratamento com GC e clorexidina reduziram a necessidade de uma superexpressão de seus inibidores.

6.7 ULTIMAS CONSIDERAÇÕES

A clorexidina foi introduzida comercialmente como um agente antisséptico há mais de 60 anos. Na clínica odontológica, ainda é considerada o agente antibiofilme mais eficaz e seguro, sendo seu uso indicado tanto para população geral quanto para grupos de pacientes de alto risco (SANTOS et al., 2017). Seu mecanismo de ação combina atividade bactericida e inibição da aderência bacteriana às superfícies dentais (MESSER; DOUGLAS, 1980). Neste estudo, as lesões periodontais induzidas por ligadura foram mitigadas mas não completamente abolidas pela aplicação tópica de clorexidina (houve redução de 45% na perda óssea alveolar), corroborando com outros estudos baseados no mesmo modelo, os quais relataram reduções de 40 a 70% na perda óssea alveolar após tratamento com clorexidina ou outros agentes antimicrobianos (BOTELHO et al., 2007; MESSER; DOUGLAS, 1980). Visto que a inserção de ligadura em ratos *germ-free* não promove danos significativos aos tecidos periodontais (GRAVES et al., 2012), estes resultados comprovam a eficácia da ligadura em concentrar populações bacterianas nos espaços subgengivais.

O efeito da clorexidina sobre perfil de expressão de marcadores inflamatórios e enzimáticos em tecidos periodontais inflamados é pouco relatado na literatura. Neste estudo, a clorexidina foi eficaz em reduzir os níveis transcricionais de importantes citocinas inflamatórias (*IL-1 β* , *COX-2*, *NOS-2*, *TGF β 1* e *INF- γ*) e em atenuar a proporção *RANKL/OPG* e a expressão de MMPs nos tecidos gengivais sob constante estímulo inflamatório. Não seria pretencioso

afirmar, portanto, que as alterações nos perfis de expressão gênica induzidas pelo uso da clorexidina se devem ao número reduzido de bactérias viáveis e de suas toxinas, e à consequente atenuação de estímulos pró-inflamatórios. O uso prolongado de clorexidina, no entanto, gera efeitos colaterais indesejados que restringem seu uso (JAMES et al., 2017).

Neste estudo, demonstramos que a aplicação tópica de uma formulação em gel orabase contendo GC, um produto natural, também foi capaz de mitigar os estímulos inflamatórios no periodonto, embora o mecanismo exato ainda não esteja esclarecido. Uma hipótese a ser testada é a de que a GC pode estar dificultando a formação de biofilme por prejudicar a coagregação bacteriana, um fenômeno que envolve o reconhecimento específico e a aderência das bactérias a elas mesmas ou a outros tipos microbianos. Este é um mecanismo essencial para o desenvolvimento e maturação de biofilmes polimicrobianos complexos. A coagregação é frequentemente mediada pela interação entre adesinas e sacarídeos microbianos e pode ser bloqueada pela adição de açúcares simples (DATTA; STAPLETON; WILLCOX, 2017). Galactose, lactose e fucose, por exemplo, foram capazes de inibir significativamente a adesão de *Porphyromonas gingivalis* à fibroblastos humanos utilizando *Fusobacterium nucleatum* como ponte (METZGER et al., 2009). Outro estudo encontrou evidências de que D-galactose não apenas reduz a formação de biofilme por competir com adesinas microbianas, mas também por inibir a atividade de moléculas de sinalização importantes para a comunicação entre bactérias (*quorum sensing*) (RYU et al., 2016). A GC é um heteropolissacarídeo formado majoritariamente por unidades de D-galactose, um forte indicativo de que ela pode estar agindo no periodonto não pela indução da morte de bactérias, mas pela inibição da formação e maturação de biofilmes bacteriana. Estudos microbiológicos e o uso biomarcadores diretamente relacionados à interação bactéria-hospedeiro podem fornecer novas evidências sobre o mecanismo de ação da GC.

7 CONCLUSÕES

- O método de purificação utilizado teve alto rendimento e resultou em uma GC livre de contaminantes;
- O gel orabase utilizado como veículo não mostrou qualquer propriedade biológica intrínseca, comprovando sua adequação para a preparação das formulações orabase contendo GC;
- O protocolo de indução de periodontodite experimental em ratos foi bem-sucedido;
- O tratamento tópico com as formulações em gel orabase contendo diferentes concentrações de GC (5 e 15%) é seguro, sem evidências de toxicidade sistêmica em modelo de periodontite em ratos;
- O tratamento com as formulações em gel orabase contendo diferentes concentrações de GC (5 e 15%) é eficaz em reduzir significativamente o *status* inflamatório em nível local e sistêmico em modelo de periodontite experimental;
- A aplicação tópica da formulação em gel contendo 15% da GC possui significativo efeito preventivo contra perda óssea alveolar em modelo de periodontite experimental;
- A aplicação tópica da formulação em gel contendo 15% da GC previne a superexpressão transcricional do principal fator ativador da osteoclastogênese (RANKL) e de fatores inflamatórios (*IL1-1 β* , *COX-2*, *NOS-2*, *INF- γ* , *TGF β 1*, *OSCAR*), sendo este efeito supressor independente de *MYD88*;
- O efeito protetor da GC não envolve a indução da expressão transcricional de citocinas anti-inflamatórias (*IL-4* e *IL-10*);
- A aplicação tópica da formulação em gel contendo 15% da GC é acompanhada por uma redução global na expressão transcricional de genes envolvidos com a degradação da matriz extracelular;
- O tratamento tópico com GC apresenta efeitos biológicos ou terapêuticos estatisticamente semelhantes ao observado com o tratamento tópico com clorexidina gel 2%, um agente antisséptico consagrado na odontologia;

- Os resultados apresentados no presente estudo, portanto, abrem perspectivas para o uso de formulações tópicas contendo GC para prevenção ou tratamento adjuvante da periodontite.

REFERÊNCIAS

AKCALI, A.; LANG, N. P. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 109–115, fev. 2018.

ARAÚJO, I. M. S. et al. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale L.*) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1588–1593, ago. 2012.

ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale L.* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, nov. 2015.

ARNOLD, P. R. et al. The effects of non-ideal temperature regimes on RNA quality from samples stored in RNA later-like buffer: an attempt to replicate field conditions. **Journal of Analytical & Molecular Techniques**, v. 2, n. 1, p. 8, 2016.

ASANTEWAA, Y. et al. Investigation of the emulsifying and suspending potential of cashew tree gum in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 215–219, 2011.

BALTACIOĞLU, E. et al. Total Oxidant Status and Bone Resorption Biomarkers in Serum and Gingival Crevicular Fluid of Patients With Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 2, p. 317–326, fev. 2014.

BARROS, S. P. et al. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 53–64, fev. 2016.

BELIBASAKIS, G. N. et al. Gene expression of transcription factor NFATc1 in periodontal diseases. **APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 119, n. 3, p. 167–72, mar. 2011.

BERMUDEZ, M. A. et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. **Experimental Eye Research**, v. 149, p. 84–92, ago. 2016.

BEUKERS, N. G. F. M. et al. Periodontitis is an independent risk indicator for atherosclerotic cardiovascular diseases among 60 174 participants in a large dental school in the Netherlands. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 71, n. 1, p. 37–42, jan. 2017.

BEZERRA, M. A. et al. Physiology of cashew plants grown under adverse conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 449–461, dez. 2007.

BONFIM, M. DE L. C. et al. Social determinants of health and periodontal disease in Brazilian adults: a cross-sectional study. **BMC Oral Health**, v. 13, n. 1, p. 22, 20 dez. 2013.

BOSSHARDT, D. D. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 43–50, fev. 2018.

BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. **Pathogenesis of Periodontal Diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2018.

BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 471–478, set. 2007.

BOTELHO, M. A. et al. Efficacy of a mouthrinse based on leaves of the neem tree (*Azadirachta indica*) in the treatment of patients with chronic gingivitis: A double-blind, randomized, controlled trial. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 2, n. 11, p. 341–346, fev. 2008.

BOTELHO, M. A. et al. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, p. 1214–1219, set. 2009.

BOTERO, J. E. et al. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 34–57, fev. 2015.

BOUCHARD, P. et al. Risk factors in periodontology: a conceptual framework. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 2, p. 125–131, fev. 2017.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–9, mar. 1982.

BRASIL. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.

CAMPI, P. et al. Endothelial dysfunction in rats with ligature-induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. **Archives of Oral Biology**, v. 63, p. 66–74, mar. 2016.

CAMPOS, D. A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, set. 2012.

CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, n. 3, p. 143–51, maio 2015.

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

HAVA, V. K.; VEDULA, B. D. Thermo-reversible green tea catechin gel for local application in chronic periodontitis: a 4-week clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 9, p. 1290–6, set. 2013.

CHAVES, L. DE S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 93–100, 26 fev. 2013.

CHIQUET, M.; KATSAROS, C.; KLETSAS, D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. **Periodontology 2000**, v. 68, n. 1, p. 21–40, jun. 2015.

CORRAINI, P. et al. Periodontal attachment loss in an untreated isolated population of Brazil. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 4, p. 610–20, abr. 2008.

CORTÉS-VIEYRA, R.; ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

COSTA, F. O. et al. Surgical and non-Surgical procedures associated with recurrence of periodontitis in periodontal maintenance therapy: 5-year prospective study. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 23 out. 2015.

CUNHA, P. L. R. et al. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 85–92, 2007.

DA SILVA, D. P. B. et al. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 395–402, 1 mar. 2018.

DA SILVA, M. K. et al. Genetic factors and the risk of periodontitis development: findings from a systematic review composed of 13 studies of meta-analysis with 71,531 participants. **International Journal of Dentistry**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

DA SILVA, R. A. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. flowers in comparison to bark and leaves extracts. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 04, n. 04, p. 87–99, 2016.

DA SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 14, 17 dez. 2014.

DA SILVEIRA VASCONCELOS, M. et al. Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 12, p. 1648–1655, 27 dez. 2015.

DAGAR, M. et al. Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: a biochemical study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 19, n. 5, p. 531, 2015.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 481–490, 1 jul. 2010.

DAS, B.; NAYAK, A. K.; NANDA, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 514–517, nov. 2013.

DATTA, A.; STAPLETON, F.; WILLCOX, M. D. P. Bacterial Coaggregation Among the Most Commonly Isolated Bacteria From Contact Lens Cases. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 1, p. 50, 6 jan. 2017.

DE JONG, T. et al. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. **Journal of Periodontal Research**, n. April, p. 1–10, 21 jun. 2017.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L.

Carbohydrate Polymers, v. 26, n. 3, p. 177–181, jan. 1995.

DELITTO, A. E. et al. MyD88-mediated innate sensing by oral epithelial cells controls periodontal inflammation. **Archives of Oral Biology**, v. 87, n. December 2017, p. 125–130, mar. 2018.

DENG, Z.-L. et al. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3703, 16 dez. 2017.

DONG, Y.; HUIHUI, Z.; LI, C. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 6, p. 758–765, dez. 2015.

DONOS, N. et al. Description of the periodontal pocket in preclinical models: limitations and considerations. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 16–34, fev. 2018.

DOS SANTOS CARVALHO, J. et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 5, p. 883–892, out. 2017.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.

EBERSOLE, J. L. et al. The periodontal war: microbes and immunity. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 52–115, out. 2017.

ENDO, Y. et al. Preventive effects of trehalose on osteoclast differentiation in rat periodontitis model. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 1, p. 33–40, jan. 2013.

FERES, M. et al. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 131–186, fev. 2015.

FIGUEIREDO, A. A. et al. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **The Laryngoscope**, p. 1–6, 27 out. 2017.

LORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

FOSTER, B. L. On the discovery of cementum. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 4, p. 666–685, ago. 2017.

FRANCO, C. et al. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 440, 17 fev. 2017.

FREIRES, I. A. et al. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v. 87, p. 196–203, mar. 2018.

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 94–105, mar. 2017.

FURLANETO, F. A. C. et al. Local administration of Tiludronic Acid downregulates important mediators involved in periodontal tissue destruction in experimental periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 88, n. February 2017, p. 1–9, abr.

2018.

FURTADO, R. et al. **Modificação química de goma de cajueiro: novas características e potencialidades de aplicações**Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza: [s.n.]. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/4779/1/Bp-023.pdf>>

GARLET, G. P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 8, p. 671–679, ago. 2004.

GARLET, G. P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 12–20, 3 jan. 2006.

GHADERI, A. et al. mRNA expression of pattern recognition receptors and their signaling mediators in healthy and diseased gingival tissues. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 2, p. 150, 2014.

GOMES, D. A. S. et al. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. **Immunological Investigations**, v. 38, n. 2, p. 117–22, 7 jan. 2009.

GORSKA, R. et al. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 12, p. 1046–1052, dez. 2003.

GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Frontiers of Oral Biology**, v. 15, p. 117–32, 2012.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 143–153, 6 fev. 2011.

GRAZIANI, F. et al. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 152–188, out. 2017.

GROEGER, S. E.; MEYLE, J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 46–67, out. 2015.

GÜRKAN, A. et al. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in several forms of periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 10, p. 906–912, out. 2006.

GÜRKAN, A. et al. Post-treatment effects of subantimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in severe, generalized chronic periodontitis. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 6, n. 2, p. 84–92, maio 2008.

HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 1 jan. 2015.

HAIJSHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J. M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 116–151, out. 2017.

HALL, M. W. et al. Inter-personal diversity and temporal dynamics of dental, tongue, and

salivary microbiota in the healthy oral cavity. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 26 dez. 2017.

HARVEY, J. D. Periodontal microbiology. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 253–269, abr. 2017.

HASAN, A.; PALMER, R. M. A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease. **British Dental Journal**, v. 216, n. 8, p. 457–461, 25 abr. 2014.

HASNAIN, M. S. et al. Extraction and characterization of cashew tree (*Anacardium occidentale*) gum; use in aceclofenac dental pastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, n. 2017, p. 1074–1081, set. 2018.

HASSAN, S. H. S. et al. Effect of periodontal surgery on osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid, saliva, and gingival tissues of chronic periodontitis patients. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

HASSELL, T. M. Tissues and cells of the periodontium. **Periodontology 2000**, v. 3, n. 1, p. 9–38, out. 1993.

HELLER, D. et al. Microbial diversity in the early in vivo-formed dental biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1881–8, 8 jan. 2016.

HIENZ, S. A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

HUSSAIN, Q. A. et al. Detection of adrenomedullin and nitric oxide in different forms of periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 1, p. 16–25, fev. 2016.

JAMES, P. et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. 247, 31 mar. 2017.

JARDIM, J. J.; ALVES, L. S.; MALTZ, M. The history and global market of oral home-care products. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 1, p. 17–22, jun. 2009.

JIANG, N. et al. Periodontal ligament and alveolar bone in health and adaptation: tooth movement. In: **Frontiers of oral biology**. [s.l.: s.n.]. v. 18p. 1–8.

JIN, L. et al. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral Diseases**, v. 22, n. 7, p. 609–619, out. 2016.

JUIZ, P. J. L.; ALVES, R. J. C.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 134–139, mar. 2010.

KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Chlorhexidine--pharmaco-biological activity and application. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 7, p. 1321–6, abr. 2015.

KARYGIANNI, L. et al. Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–17, 14 jan. 2016.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a

systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 4, p. 380–387, abr. 2017.

KEESTRA, J. A. J. et al. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 3, p. 294–314, jun. 2015.

HALAF, H.; LÖNN, J.; BENGTSSON, T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: Possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. **Cytokine**, v. 67, n. 1, p. 29–35, maio 2014.

KHARAEVA, Z. F. et al. Effects of standardised fermented papaya gel on clinical symptoms, inflammatory cytokines, and nitric oxide metabolites in patients with chronic periodontitis: an open randomised clinical study. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

KHOLY, K. EL; GENCO, R. J.; VAN DYKE, T. E. Oral infections and cardiovascular disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 315–321, jun. 2015.

KIM, Y. S. et al. Effects of Polycan, a β -glucan, on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 6, p. 800–810, dez. 2012.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17038, 22 jun. 2017.

KONAN, N. A. et al. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 30–38, mar. 2007.

KUBOTA, T. et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 1, p. 166–73, jan. 2008.

KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 2, p. 101–106, abr. 2004.

KUMAR, A. et al. Cashew gum a versatile hydrophyllic polymer: a review. **Current Drug Therapy**, v. 7, n. 1, p. 2–12, 1 abr. 2012.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac gel. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 695–704, 2009.

KURGAN, S.; KANTARCI, A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 51–67, fev. 2018.

KURU, L. et al. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 7, p. 527–533, jul. 2004.

LARSEN, T.; FIEHN, N.-E. Dental biofilm infections - an update. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 376–384, abr. 2017.

LEE, H. J. et al. *Angelica dahurica* ameliorates the inflammation of gingival tissue via

regulation of pro-inflammatory mediators in experimental model for periodontitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 16–21, jun. 2017.

LEIRA, Y. et al. Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 1, p. 43–53, 2017.

LERTPIMONCHAI, A. et al. The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Dental Journal**, v. 67, n. 6, p. 332–343, dez. 2017.

LEVINSON, W. **Review of medical microbiology and immunology**. 13th. ed. [s.l.] AMGH Editora Ltda., 2016.

LI, Y.-H.; HUANG, X.; TIAN, X.-L. Recent advances in dental biofilm: impacts of microbial interactions on the biofilm ecology and pathogenesis. **AIMS Bioengineering**, v. 4, n. 3, p. 335–350, 2017.

LIN, M. et al. Different engagement of TLR2 and TLR4 in *Porphyromonas gingivalis* vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. 1–10, 21 ago. 2017.

LIU, Z. et al. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. **Disease Markers**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

LÓPEZ, R.; BAELUM, V. Periodontal disease classifications revisited. **European Journal of Oral Sciences**, v. 123, n. 6, p. 385–389, dez. 2015.

MARKETS AND MARKETS. **Oral Care/Oral Hygiene Market by Product (Toothbrush (Manual, Electric, Battery-Powered), Toothpaste, Mouthwash, Dental Floss, Teeth Whitening, Breath Freshener, Fixative), Distribution Channel (Consumer Store, Drug Store, Online) - Global Forecast to 2022**. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/oral-care-market-80546246.html>>. Acesso em: 16 mar. 2018.

MARQUES, M. R.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; XAVIER-FILHO, J. Antimicrobial and insecticidal activities of cashew tree gum exudate. **Annals of Applied Biology**, v. 121, n. 2, p. 371–377, out. 1992.

MARTINS, C. S. et al. Topical HPMC/S-Nitrosoglutathione Solution Decreases Inflammation and Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease in Rats. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153716, 26 abr. 2016.

MELLA, J. R. et al. Location, location, location: cytokine concentrations are dependent on blood sampling site. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 42, n. 4, p. 337–42, out. 2014.

MELO, A. F. M. DE et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 202–205, jun. 2006.

MENESTRINA, J. M. et al. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 715–721, mar. 1998.

MESSER, H. H.; DOUGLAS, W. H. Inhibition by chlorhexidine of alveolar bone loss in

mice. **Journal of Periodontal Research**, v. 15, n. 6, p. 646–9, nov. 1980.

METZGER, Z. et al. Enhanced Attachment of *Porphyromonas gingivalis* to Human Fibroblasts Mediated by *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 1, p. 82–85, jan. 2009.

MEURIC, V. et al. Signature of microbial dysbiosis in periodontitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 14, p. 1–13, 15 jul. 2017.

MIZE, T. W. et al. Increased and correlated expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor beta 1 in surgically removed periodontal tissues with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 3, p. 315–319, jun. 2015.

MOCHIZUKI, S. et al. Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 5, p. 333–343, out. 2004.

MORO, M. G. et al. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, p. 1–10, 19 jan. 2018.

NAGATA, H. et al. Effect of eucalyptus extract chewing gum on periodontal health: a double-masked, randomized trial. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1378–85, ago. 2008.

NAKANISHI, T.; KAIHO, F.; HAYASHI, M. Improvement of drug release rate from carbopol 934P formulation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 171–3, jan. 1998.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, n. 1, p. 11–28, fev. 2006.

NASRA, M. M. A. et al. Formulation, in-vitro characterization and clinical evaluation of curcumin in-situ gel for treatment of periodontitis. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 133–142, 3 jan. 2017.

NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 2, p. 72–80, 2017.

NEȚZI-GÓRA, M.; KOWALSKI, J.; GÓRSKA, R. The immune response in periodontal tissues. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 5, p. 421–429, 6 out. 2017.

NEMETH, K. et al. The Role of Osteoclast-Associated Receptor in Osteoimmunology. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 13–18, 1 jan. 2011.

NI, J. et al. Protective effects of paeoniflorin on alveolar bone resorption and soft-tissue breakdown in experimental periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 2, p. 257–264, abr. 2016a.

OKONKWO, T. J. N. et al. Sub-chronic hepatotoxicity of *Anacardium occidentale* (*Anacardiaceae*) inner stem bark extract in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 3, p. 353, 2010.

OKOYE, E. I.; ONYEKWELI, A. O.; KUNLE, O. O. Solid state characterization of *Anacardium occidentale* gum. **Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology**, v. 4, n. 19, p. 3709–3716, 2012.

P POPAT, R.; BHAVSAR, N. V.; POPAT, P. R. Gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in periodontal health and disease. **Singapore Dental Journal**, v. 35, p. 59–64, dez. 2014.

PAPAPANOU, P. N.; SUSIN, C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 45–51, out. 2017.

PAPATHANASIOU, E. et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 55–61, fev. 2014.

PAULA, R. C. M. DE; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, n. 1, p. 27–35, 1998.

PAWAR, S. P. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Anacardium Occidentale* leaf extracts. **Ancient Science of Life**, v. 19, n. 3–4, p. 169–73, jan. 2000.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 19 nov. 2005.

POLLANEN, M. T.; SALONEN, J. I.; UITTO, V.-J. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 31, n. 1, p. 12–31, fev. 2003.

PORTO, B. C. et al. Effect of dynamic high pressure on technological properties of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 187–193, set. 2015.

QUEIROZ, L. S. et al. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 34–42, jan. 2010.

QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 567–575, 10 fev. 2017.

QUELEMES, P. V et al. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4969–81, 1 mar. 2013.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 1, p. 160–9, jan. 2014.

REDDY, N. et al. Estimation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 3, p. 301, 2014.

REDDY, NR. et al. Estimation of prostaglandin E 2 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 303, 2013.

REHER, V. G. S. et al. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. **Journal of Oral Science**, v. 49, n. 4, p. 271–276, 2007.

RENN, T.-Y. et al. Prophylactic supplement with melatonin successfully suppresses the pathogenesis of periodontitis through normalizing RANKL/OPG ratio and depressing the TLR4/MyD88 signaling pathway. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 3, p. e12464, abr. 2018.

RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, ago. 2016.

RIGHOLT, A. J. et al. Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 5, p. 501–507, 17 maio 2018.

ROBERTS, F. A.; DARVEAU, R. P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 18–27, out. 2015.

RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. DE; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais : comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, p. 31–36, 1993.

RYU, E.-J. et al. D-Galactose as an autoinducer 2 inhibitor to control the biofilm formation of periodontopathogens. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 632–637, set. 2016.

SAFFAR, J.-L.; LASFARGUES, J.-J.; CHERRUAU, M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. **Periodontology 2000**, v. 13, n. 1, p. 76–90, fev. 1997.

SAHNI, J. et al. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 3, p. 106, jul. 2012.

SALEEM, H. G. M. et al. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 214, 15 dez. 2016.

SANTOS, G. O. DOS et al. Chlorhexidine with or without alcohol against biofilm formation: efficacy, adverse events and taste preference. **Brazilian Oral Research**, v. 31, n. 0, p. e32, 4 maio 2017.

SASAKI, H. et al. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 6, p. 432–441, dez. 2004.

SATTARI, M. et al. Effect of surgical flap on IL-1 β and TGF- β concentrations in the gingival crevicular fluid of patients with moderate to severe chronic periodontitis. **Iranian Journal of Immunology**, v. 8, n. 1, p. 20–6, mar. 2011.

SCAREL-CAMINAGA, R. et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphisms and nitric oxide levels in individuals with chronic periodontitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1128, 15 jun. 2017.

SCHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149–154, fev. 2006.

SCHULTZ, H. S. et al. OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 952–963, abr. 2016.

SCOTT, D. A.; KRAUSS, J. Neutrophils in Periodontal Inflammation. p. 56–83, 2011.

SHEN, Y. et al. Experimental and theoretical investigation of multispecies oral biofilm resistance to chlorhexidine treatment. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 21 jun. 2016.

SHETTY, AV. et al. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 69, 2015.

SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–55, jun. 2015a.

SILVA, T. M. et al. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization — Structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 4, p. 526–530, maio 2010.

SILVA, V. DE O. et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) reduce glucose levels and attenuate alveolar bone loss in diabetic rats with periodontal disease. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. 1–13, 20 ago. 2015b.

SINGHAL, R. et al. Efficacy of *Acacia arabica* gum as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **The Saudi Dental Journal**, v. 30, n. 1, p. 53–62, jan. 2018.

SMILEY, C. J. et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. **The Journal of the American Dental Association**, v. 146, n. 7, p. 508–524.e5, jul. 2015.

SOJOD, B. et al. RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: new evidence from a RANK transgenic mouse model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 338, 24 maio 2017.

SOUZA, D. M. DE et al. Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 18, n. 5, p. 493–7, 2010.

SOUZA FILHO, M. D. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 1093–1101, fev. 2018

SOUZA, N. C. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Anacardium occidentale* leaf extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

STRUILLLOU, X. et al. Experimental animal models in periodontology: a review. **The Open Dentistry Journal**, v. 4, n. 1, p. 37–47, 29 abr. 2010.

SUN, J.-Y. et al. Baicalin inhibits toll-like receptor 2/4 expression and downstream signaling in rat experimental periodontitis. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 86–93, jul. 2016.

SUSIN, C. et al. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 4, p. 326–333, abr. 2011.

TÉDONG, L. et al. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p. 140–7, 13 nov. 2006.

TORQUATO, D. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505–507, jul. 2004.

TROMBONE, A. P. et al. Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences. **Genes & Immunity**, v. 11, n. 6, p. 479–489, 29 set. 2010.

UTTER, D. R.; MARK WELCH, J. L.; BORISY, G. G. Individuality, stability, and variability of the plaque microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 564, 22 abr. 2016.

VAN DER VELDEN, U. What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 24–44, out. 2017.

VAN LEEUWEN, M. P. C.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 2, p. 174–94, fev. 2011.

VANDERLINDE, F. A. et al. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 437–442, set. 2009.

VARDAR-SENGUL, S. et al. The effects of selective COX-2 inhibitor/celecoxib and omega-3 fatty acid on matrix metalloproteinases, TIMP-1, and laminin-5gamma2-chain immunolocalization in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 10, p. 1934–41, out. 2008.

VARGHESE, J. et al. Antimicrobial effect of *Anacardium occidentale* leaf extract against pathogens causing periodontal disease. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 08, p. 15–18, 2013.

VIKRAM, V. et al. Changes in Transforming Growth Factor- β 1 in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Chronic Periodontitis Following Periodontal Flap Surgery. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 2, p. 13–16, fev. 2015.

YAMAMOTO, T. et al. Histology of human cementum: its structure, function, and development. **Japanese Dental Science Review**, v. 52, n. 3, p. 63–74, ago. 2016.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241–248, jul. 2015.

YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, p. e7, 5 jan. 2013.

ZHANG, L. et al. Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 4, p. 1–6, 2016.

APÊNDICE

(Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal)



1

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

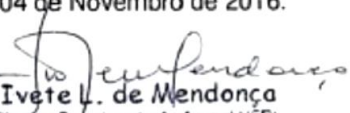
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: cecapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo do Potencial Terapêutico e Biotecnológico de Polissacarídeos no tratamento da Periodontite induzida em ratos**", registrada nº **229/16**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS- Biologia_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **04/11/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Dezembro/ 2016 à Dezembro/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	126
Peso/ Idade	190-230g/ 42 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de Manutenção de Animais destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 04 de Novembro de 2016.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora