



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUCAS EDUARDO SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*
(JACQ., 1760) NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

**PARNAÍBA – PI
2019**

LUCAS EDUARDO SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*
(JACQ., 1760) NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Química e Bioquímica aplicadas à Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

O482a Oliveira, Lucas Eduardo Silva
 Avaliação do efeito de proteínas do látex de plumeria pudica (Jacq.,
 1760) na periodontite induzida por ligadura em ratos [manuscrito] /
 Lucas Eduardo Silva Oliveira. – 2019.
 70 f. : il. color.

 Impresso por computador (printout).
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
 Piauí, 2019.
 Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

 1. Proteínas Laticíferas. 2. Inflamação. 3. Doença Periodontal. I.
 Título.

CDD: 617.645

LUCAS EDUARDO SILVA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*
(JACQ.,1760) NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
UFPI
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí
Orientador e presidente

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
UFPI
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho
UFPI
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí

“Não estacione sua alma em espaços onde não cabem seus sonhos. ”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, por me proporcionar viver momentos como esses, por todas as dádivas concedidas e por sempre guiar meus passos.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira**, por todos esses anos de ensinamento, por sempre acreditar em mim e por me fazer acreditar ser capaz, por toda paciência que teve comigo, e por ter aceito me orientar desde a graduação, és inspiração profissional e pessoal para mim, irei sempre levar seus ensinamentos comigo.

Ao **Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**, em ter aberto as portas do laboratório LAPHIS para mim, por sua parceria para que este projeto fosse realizado e por ter aceito convite para ser membro desta banca.

Ao **Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho**, por mais uma vez ter aceito convite para participar desta banca, agora de defesa de dissertação e contribuir de forma grandiosa com seus ensinamentos.

Aos meus prezados colegas/amigos **Lucas de Araújo Bastos Santana e Diego Passos Aragão**, pelo incentivo, ajuda e companheirismo no início de minha trajetória dentro da pesquisa.

Sou grato ao laboratório **BIOMIC**, em especial à “**equipe PLPp**”, mais do que colegas de trabalho, amigos que dividiram comigo experiências, aprendizado, muito trabalho, risos e bons momentos, **Lucas Arruda Moita, Felipe Cardoso de Brito, Naylla Moraes Veras Oliveira, Bruna Silva Souza, Mayck Silva Barbosa, Ana Clara Silva Sales, Francisca Dayane Soares, Gabriella Linhares de Andrade e Joana D’arc**.

Aos meus queridos amigos, **Alan Leandro de Carvalho Farias e Victor Lucas Ribeiro Lopes**, que me ajudaram a conduzir esta pesquisa, com muito empenho e dedicação e por todos os conselhos dados.

Agradeço ao laboratório **LAPHIS**, onde realizei em conjunto boa parte dos experimentos, lá encontrei mais do que companheiros de profissão, mas amigos verdadeiros, foi prazeroso o convívio com estas pessoas, **Luiz Felipe de Carvalho França, Even Herlany Pereira da Silva, André dos Santos**, agradeço aos colegas que me ajudaram durante os experimentos **Bruno Almeida Arrais Landim, Hélio Mateus Silva Nascimento**.

Agradeço a laboratório **LAFFEX**, em especial à **Francisca Beatriz de Melo Sousa e Ana Patrícia de Oliveira**, por todo auxílio durante os experimentos.

Sou profundamente grato aos meus pais, **Francisco Pedro de Sousa. Oliveira e Maria de Lourdes da Costa Silva**, já que são minha base, por mostrarem à mim que o

melhor caminho a ser trilhado é o da educação, e que tudo pode demorar a acontecer, mas para quem merece nunca é tarde.

Agradeço ao meu irmão **Pedro Vagner Silva Oliveira**, por todos os conselhos dados, pelas inúmeras conversas tidas e por ser meu verdadeiro amigo em todos os momentos que precisei.

À **Tairly Maria Costa Sales**, por sempre me apoiar, acreditar em mim, onde em meus momentos de aflição consegue me suportar, acalmar, acalentar meu coração, pelo amor verdadeiro e carinho que me transmite, conselhos sinceros e por me fazer querer ser melhor do que um dia eu já quis ser.

À agência de fomento **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

O látex de plantas é fonte de moléculas bioativas com potencial farmacológico, onde diversos estudos vêm sendo realizados, dentre os quais se encontram o látex de *Plumeria pudica*. Proteínas encontradas no látex de *P. pudica* (PLPp) apresentaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos animais quando administradas na dose de 40mg/kg via intraperitoneal (*i. p.*), além de ser verificado sua baixa toxicidade em nível sistêmico. A periodontite caracteriza-se pelo acúmulo de biofilme nos tecidos orais, é uma doença global, tendo destaque como agravo à saúde pública. Sua relação vai além dos tecidos que afeta, dita como sistêmica, é capaz de relacionar-se com outras patologias. Diante dos resultados atualmente descritos, referentes ao potencial farmacológico de PLPp e aos agravos produzidos direta ou indiretamente pelos efeitos da periodontite, objetivou-se, avaliar os efeitos de PLPp, na periodontite induzida por ligadura em ratos. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle negativo (n=9), grupo periodontite (n=10) e grupo PLPp (n=8), onde os animais sofreram indução da periodontite e foram tratados com PLPp na dose de 40mg/kg. A periodontite experimental foi induzida a partir de ligadura por fio de nylon 3.0, colocado entre a região mesial e distal do primeiro molar inferior, em ambos os lados. Os animais permaneceram 20 dias com a ligadura, foram realizados tratamentos diários dos mesmos com PLPp, via *i. p.* Após os 20 dias, foi realizada avaliação clínica macroscópica para Índice de Sangramento Gengival (ISG) e Índice de Profundidade de Sondagem (IPS), para parâmetros inflamatórios. Coletou-se amostras de sangue através do plexo retro-orbital de cada animal, parte do sangue foi coletado na presença de EDTA, destinando-se a contagem total de leucócitos, e outra parte sem anticoagulante, para análise de marcadores de lesão hepática de aminotransferases (ALT e AST) e renal (creatinina e ureia) e alguns outros biomarcadores (ácido úrico, albumina, cálcio, colesterol total, HDL, fosfatase alcalina e proteínas totais). Os animais foram eutanasiados, retirados fígado e rim, para avaliação sistêmica de prováveis alterações relacionadas com a periodontite em ambos os órgãos, a partir dos níveis de GSH, concentrações de MDA e atividade de MPO. As mandíbulas foram analisadas morfometricamente para avaliação da perda de Altura Óssea Alveolar (AOA). Tecido gengival e hepático foram utilizados para mensurar atividade de MPO. Como resultados, em análises macroscópicas nos animais tratados, houve redução de parâmetros inflamatórios avaliados, demonstrando redução de ISG e IPS quando comparado ao grupo indução sem tratamento. Houve redução na AOA de animais tratados com PLPp e também foi vista redução na contagem total de leucócitos no sangue de animais tratados em contraste com o grupo periodontite. Em relação ao peso dos animais não foi notada diferença significativa entre grupos. Foi vista diminuição significativa da atividade de MPO apenas no tecido gengival de animais tratados. No tecido hepático, níveis de GSH e MDA foram preservados próximos a normalidade em animais tratados com PLP, o mesmo não foi visto para o tecido renal. Em análises bioquímicas de marcadores hepáticos apenas ALT apresentou-se próximo a normalidade, o mesmo pode ser visto para creatinina com relação a marcador renal, quando comparados ao grupo saudável. PLPp reduziu parâmetros inflamatórios e a perda óssea alveolar, além de conservar o padrão de alguns biomarcadores, contudo, estudos mais aprofundados utilizando a fração devem ser conduzidos, para melhor entendimento de seu mecanismo.

Palavras-Chave: Proteínas laticíferas, Inflamação, Doença periodontal.

ABSTRACT

Title: EVALUATION OF THE EFFECT OF LATEX PROTEINS FROM *Plumeria pudica* (JACQ. 1760) ON PERIODONTITIS INDUCED BY LIGATURE IN RATS

The latex of plants is a source of bioactive molecules with pharmacological potential, where several studies have been carried out, among which are *Plumeria pudica* latex. Proteins found in latex of *P. Pudica* (LPPp) showed anti-inflammatory and antinociceptive activity in animal models when administered at a dose of 40 mg / kg intraperitoneally (*i.p.*), in addition to being verified its low toxicity at a systemic level. The periodontitis is characterized by the accumulation of biofilm in oral tissues, it is a global disease, being highlighted as an aggravation to public health. Its relation goes beyond the tissues it affects, said as systemic, it is able to relate to other pathologies. In view of the currently described results, concerning the pharmacological potential of LPPp and the damages directly or indirectly produced by the effects of periodontitis, the objective was to evaluate the effects of LPPp on the periodontitis induced by ligation in rats. The animals were divided into three groups: negative control group (n = 9), periodontitis group (n = 10) and LPPp group (n = 8), where animals were induction of periodontitis and treated with LPPp at a dose of 40mg / kg. Experimental periodontitis was induced from nylon 3.0 ligation, placed between the mesial and distal region of the first lower molar, on both sides. The animals remained 20 days with the ligation, daily treatments of the same were carried out with LPPp, via *i. p.* After 20 days, a macroscopic clinical evaluation was performed for Gingival Bleeding Index (GBI) and Probing Pocket Depth (PPD) for inflammatory parameters. Blood samples were collected through the retro-orbital plexus of each animal, part of the blood was collected in the presence of EDTA, for total leukocyte counts, and another part without anticoagulant, for the analysis of biomarkers of hepatic aminotransferase injury (ALT and AST) and renal (creatinine and urea) and some other biomarkers (uric acid, albumin, calcium, total cholesterol, HDL, alkaline phosphatase and total proteins). The animals were euthanized, removed liver and kidney, for systemic evaluation of probable changes related to periodontitis in both organs, from GSH levels, MDA concentrations and MPO activity. Jaws were analyzed morphometrically for evaluation of Alveolar Bone Height (ABH) loss. Gingival and hepatic tissue were used to measure MPO activity. As results, in macroscopic analyzes in the treated animals, there was reduction of inflammatory parameters evaluated, demonstrating reduction of ISG and IPS when compared to the induction group without treatment. There was a reduction in the AOA of LPPp-treated animals and a reduction in the total leukocyte count in the blood of treated animals contracted with the periodontitis group was also seen. Regarding the weight of the animals, no significant difference was observed between groups. Significant decrease in MPO activity was seen only in the gingival tissue of treated animals. In hepatic tissue, levels of GSH and MDA were preserved close to normal in LPPp-treated animals, the same was not seen for renal tissue. In biochemical analyzes of hepatic markers only ALT was close to normal, the same can be seen for creatinine in relation to renal marker, when compared to the healthy group. LPPp reduced inflammatory parameters and alveolar bone loss, in addition to maintaining the pattern of some biomarkers, however, further studies using the fraction should be conducted for a better understanding of its mechanism.

Key words: Laticifer proteins, Inflammation, Periodontal disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta <i>Plumeria pudica</i>	20
Figura 2. Anatomia do peridonto saudável.....	23
Figura 3. Ilustração de periodontite agressiva.....	24
Figura 4. Mesa operatória para início do processo da indução da periodontite.....	32
Figura 5. Procedimento inicial para induzir a doença periodontal.....	33
Figura 6. Esquematização do tratamento em ratos por via <i>i. p.</i>	33
Figura 7. Medidas morfométricas da Altura Óssea Alveolar – AOA.....	35
Figura 8. Visualização macroscópica do molar inferior direito de animais.....	40
Figura 9. Efeitos de PLPp sobre o Índice de Sangramento Gengival.....	41
Figura 10. Efeitos de PLPp sobre o Índice de Profundidade de Sondagem.....	41
Figura 11. Mensuração de Mieloperoxidase no tecido gengival e hepático.....	42
Figura 12. Altura Óssea Alveolar.....	43
Figura 13. Variação do peso de animais.....	44
Figura 14. Contagem Total de Leucócitos.....	45
Figura 15. Efeitos de PLPp sobre os níveis de Glutathiona Reduzida.....	46
Figura 16. Efeitos de PLPp sobre a concentração de Ácido Malondialdeído.....	47
Figura 17. Mensuração de transaminases AST e ALT.....	48
Figura 18. Dosagem de Ureia e Creatinina no soro sanguíneo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escores macroscópicos de inflamação.....	34
Tabela 2. Peso úmido (g) de órgãos (fígado e rim) de ratos submetidos a periodontite induzida e tratados com proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (40mg/kg)	45
Tabela 3. Avaliações de biomarcadores sanguíneos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACT – Ácido Tricloroacético
ALT – Alanina Aminotransferase
ANOVA – Análise de Variância
AOA – Altura Óssea Alveolar
AST – Aspartato Aminotransferase
CAT - Catalase
CDC – Centro de controle de doenças norte-americano
CD4⁺ – Grupo de diferenciação 4
CD8⁺ – Grupo de diferenciação 8
COA – Crista Óssea Alveolar
CTL – Contagem Total de Leucócitos
DP – Doença Periodontal
d.p. – Desvio Padrão
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
GSH – Glutationa Reduzida
H&E – Hematoxilina-Eosina
IM – Intramuscular
i. p. – intraperitoneal
JEC – Junção Esmalto-Cemento
LOX - Lipooxigenase
MDA – Ácido Malondialdeído
MG – Margem Gengival
MPO – Mieloperoxidase
PBS – Tampão Fosfato Salina
PLPp – Proteínas do Látex de *Plumeria pudica*
PG – Papila Gengival
SOD – Superóxido Dismutase
v. o. – Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 CARACTERÍSTICAS DE PLANTAS LATICÍFERAS	17
2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA	18
2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PLANTAS LATICÍFERAS	19
2.4 GÊNERO PLUMERIA L. E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	20
2.5 PERIODONTO	23
2.6 PERIODONTITE.....	25
2.7 PERIODONTITE E POSSÍVEIS EFEITOS SISTÊMICOS	27
2.8 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA PERIODONTITE.....	27
2.8 PRODUTOS NATURAIS E A PERIODONTITE	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 GERAL	31
3.2 ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL	32
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	32
4.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE	33
4.4 TRATAMENTO.....	34
4.5 ANÁLISES MACROSCÓPICAS PARA AVALIAR INFLAMAÇÃO	35
4.5.1 Índice de Sangramento Gengival (ISG)	35
4.5.2 Índice de Profundidade de Sondagem (IPS)	35
4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	35
4.7 RELAÇÃO ENTRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	36
4.8 RELAÇÃO ENTRE PESO DO ÓRGÃO POR PESO CORPORAL.....	36
4.9 CONTAGEM TOTAL DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS.....	37
4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	37
4.10.1 Avaliação de atividade de Mieloperoxidase (MPO)	37
4.10.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).....	37
4.10.3 Determinação da concentração de Ácido Malondialdeído (MDA).....	38
4.10.4 Dosagem de Ureia sérica.....	38
4.10.5 Dosagem de Creatinina sérica.....	39
4.10.6 Dosagem de AST e ALT no soro sanguíneo.....	39
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
5. RESULTADOS	41

5.1	ÍNDICE DE SANGRAMENTO GENGIVAL (ISG)	41
5.2	ÍNDICE DE PROFUNDIDADE DE SONDAÇÃO (IPS)	42
5.3	MENSURAÇÃO DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	43
5.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ALTURA ÓSSEA ALVEOLAR (AOA)...	44
5.5	RELAÇÃO ENTRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	45
5.6	RELAÇÃO ENTRE PESO DO ÓRGÃO POR PESO CORPORAL.....	45
5.7	CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS (CTL)	46
5.8	DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	47
5.9	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO MALONDIALDEÍDO....	48
5.10	MENSURAÇÃO DE AMINOTRANSFERASES (AST E ALT)	49
5.11	VERIFICAÇÃO DE UREIA E CREATININA SÉRICA	50
5.12	BIOMARCADORES SANGUÍNEOS	51
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÃO.....	59
8.	REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXO I	71

1. INTRODUÇÃO

Entre todos os elementos que compõem a biodiversidade, diferentes espécies de plantas são utilizadas como principal fonte de matéria-prima para formulação de substâncias medicamentosas, como os fitoterápicos. Atualmente, fármacos à base de plantas são responsáveis por aproximadamente 30% de todos os produtos farmacêuticos disponíveis no mercado (COSTA *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2015). São descritos na literatura os potenciais farmacológicos que numerosas espécies de plantas exibem, inclusive espécies laticíferas, muitas das quais são utilizadas na atualidade como fontes de princípios ativos para o tratamento de doenças (DE ARVELO; RAMIS; ALONSO, 2013).

O látex produzido por algumas espécies de plantas, poder ser entendido com uma suspensão ou emulsão de partículas encontradas em um fluido aquoso, contendo uma variedade de metabólitos da planta, geralmente mantidos sobre pressão nas células do organismo vegetal. (CASTELBLANQUE *et al.*, 2017; HUA *et al.*, 2017). Nas plantas produtoras de látex, existem células especializadas ou canais celulares conectados, com formas estruturais ramificadas, que se alongam por toda estrutura física do organismo, denominadas de laticíferos (ZHANG *et al.*, 2017; KITAJIMA *et al.*, 2018). Estas possuem a função de produzir e armazenar o exsudato leitoso (GAMA; RUBIANO; DEMARCO, 2017).

Diversos são os estudos que descrevem o potencial anti-inflamatório que moléculas encontradas no látex de plantas exibem, além de inibir a liberação de moléculas diretamente ligadas ao processo de estresse oxidativo (SALEEM *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2017; SALIM *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019). Outras propriedades como atividade antimicrobiana também podem estar ligadas, foram observadas susceptibilidade em diferentes espécies de microrganismos, dentre os quais encaixam-se os patogênicos à molécula presente em fluidos laticíferos (EMIRU *et al.*, 2019).

Já foram descritas algumas potencialidades farmacológicas encontradas no látex da planta *P. pudica*, como atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da fração proteica, além apresentar baixa toxicidade tecidual (FERNANDES *et al.*, 2015; SOUZA, 2018).

A periodontite apresenta-se como uma condição patológica da cavidade oral humana, considerada global, chega a afetar aproximadamente 10% da população mundial adulta, e vem aumentando consideravelmente sua prevalência em idosos de 60 a 65 anos, podendo alcançar índices de 70 a 85% nessa faixa etária (BOSTANCI & BELIBASAKIS, 2018).

Organizações de saúde, reconhece a periodontite como uma patologia bucal, responsável por afetar boa parte das populações socioeconomicamente mais baixas e

vulneráveis, sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública (ROMERO & HERNANDEZ, 2018). Dados epidemiológicos do CDC (Centro de controle e prevenção de doenças norte-americano), informam que aproximadamente metade da população norte-americana adulta, por volta dos 30 anos, apresenta a doença periodontal em sua forma mais avançada (SEN *et al.*, 2018).

A periodontite crônica é uma doença inflamatória irreversível, caracteriza-se por afetar o periodonto e destruir os tecidos periodontais de suporte e proteção, em especial, o osso alveolar (BOSCO *et al.*, 2007). As primeiras manifestações clínicas relacionadas, baseiam-se na perda clínica de inserção, perda óssea alveolar, formação de uma bolsa periodontal e quadros de inflamação gengival, com regressão da mesma. O aparecimento da doença pode estar relacionado a uma gama de fatores complexos, os quais podem estar associados aos hábitos sociais, fatores sistêmicos, genéticos, celulares, instalação e primordialmente a instalação de biofilme bacteriano nos dentes, que corroboram, gerando respostas biológicas e fisiológicas agressivas e destrutivas para o organismo afetado (LISTGARTEN, 1986; FLEMMIG, 1999).

A dificuldade da terapia periodontal em questão de poder se relacionar com respostas não satisfatórias, mais especificamente com a regeneração do tecido ósseo e ao alto custo do tratamento, remete a necessidade de alternativas para prevenção e tratamento de desta doença (PALOMBO *et al.*, 2011). Diferentes estratégias têm sido estudadas para o controle da periodontite crônica, já que seu tratamento dentro da clínica odontológica, que consiste na redução mecânica do biofilme por raspagem, pode levar a recidivas, além da degeneração tecidual, principalmente a nível de periodonto, tornando-se incapaz reversão através deste tipo de tratamento (ALMEIDA *et al.*, 2014, AKHALWAYA; VUUREN; PATEL, 2018).

Alguns estudos, demonstram a utilização de produtos biológicos, com enfoque em plantas medicinais e moléculas extraídas, relacionadas ao combate da periodontite e suas manifestações sistêmicas (HATIPOGLU *et al.*, 2015, DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Os relatos científicos anteriormente descritos, demonstram a potencialidade da fração proteica de *P. pudica* e de suas moléculas bioativas, justificando a necessidade em investigar seus efeitos biológicos na tentativa de reduzir e minimizar a progressão e danos sejam localizados ou sistêmicos gerados pela periodontite.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DE PLANTAS LATICÍFERAS

De acordo com dados literários, existem aproximadamente mais de 20.000 espécies de plantas produtoras de látex, entre as 40 famílias de plantas angiospermas, do qual, aproximadamente, 2.000 espécies são reconhecidas como produtoras de borracha (cis-1-4-poliisopreno) (KONNO, 2011; ZHAI *et al.*, 2018). Estimativas apontam que existem aproximadamente 12 a 35 mil espécies de plantas laticíferas com potencial farmacológico ainda não investigado (ARRUDA *et al.*, 2016).

A presença do látex é uma das características mais marcantes das plantas pertencentes às famílias Apocyanaceae, Euphorbiaceae e Moraceae (BINDHU & SINGH, 2014). O produto látex, pode ser entendido como, um conteúdo citoplasmático, secretado a partir de células, tendo em sua composição diferentes metabólitos produzidos principalmente, no retículo endoplasmático e plastídios dos organismos vegetais (GAMA; RUBIANO; DEMARCO, 2017). O látex de plantas é uma ótima fonte de moléculas com atividades farmacológicas, pesticidas e com atividade de imunidade a agentes alergênicos (RAO & RAJU, 2016).

Células especializadas alongadas ou interconectadas, conhecidas como laticíferos, são responsáveis por armazenar este fluido, estas células permanecem sob constante pressão e ao sofrerem algum dano de forma mecânica ou por herbivoria, iniciam um processo de coagulação para impedir a perda de nutrientes da planta, liberando grande quantidade de fluido leitoso (HUBER *et al.*, 2016).

Os laticíferos podem ser encontrados como não articulados, constituídos por uma única célula multinucleada que se ramifica com o crescimento do espécime vegetal, ou como laticíferos articulados, que se caracterizam pelo agrupamento de diversas células com paredes delgadas e porosas; os diferentes tipos podem se apresentarem ramificados, formando uma rede de tubos que percorre os diferentes tecidos da planta (MARINHO *et al.*, 2018)

As funções atribuídas ao látex de plantas, sugerem ser um sistema de defesa das plantas contra herbívoros e microrganismo e até mesmo contra doenças, por apresentarem substâncias ou moléculas tóxicas e repelentes, sob pressão, prontas para ser exsudadas em resposta a qualquer dano biológico. Além de selar o ferimento e restaurar as propriedades mecânicas das mesmas, impedindo entrada de patógenos (PICKARD *et al.*, 2007; BAUER *et al.*, 2013; ARRUDA *et al.*, 2016; MARINHO *et al.*, 2018).

2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FLUIDOS LATICÍFEROS

O aspecto leitoso do látex é sua característica mais frequente, podendo ser encontrado em coloração amarela, laranja, vermelha, marrom, esverdeada ou mesmo incolor dependendo de concentrações de moléculas existentes neste produto. Com base em diferentes estudos, sua coloração pode variar em diferentes partes anatômicas da planta ou pode ser alterada após o látex ser exsudado da planta (NAJMADDIN & KHALID, 2018). A quantidade de látex liberada pelo ponto lesado na espécie vegetal depende significativamente do gênero e família ao qual pertence (KONNO, 2011). A fórmula molecular do látex é descrita como, C_3H_3N (carbono, hidrogênio e nitrogênio), sendo constituído por glicolipídeos, alcaloides, proteínas laticíferas e fosfatos ácidos (RAO & RAJU, 2016).

Diversos estudos se concentram na investigação de características bioquímicas do látex, sua composição química pode ser descrita como altamente complexa e variável, dependendo da espécie de planta que o produz, entre moléculas encontradas em sua composição podem ser citadas altas concentrações de alcalóides, flavonóides terpenóides, cardenólídeos, borracha, compostos fenólicos e amido, assim como proteínas em suas mais diferentes classes, no que se destacam proteases, oxidases, lectinas, quitinases e glicosidases, além de moléculas como carboidratos, vitaminas e lipídeos (KONNO, 2011; KITAJIMA *et al.*, 2018; BAUER *et al.*, 2013; CASTELBLANQUE *et al.*, 2017).

As proteases são moléculas que estão abundantemente presentes em uma variedade de organismos, são a maior classe de proteínas hidrolíticas de natureza enzimática, moléculas de extrema importância em processos naturais das plantas, bem como, crescimento e desenvolvimento do vegetal, ou até mesmo durante o processo germinativo (DOMSALLA & MELZIG, 2008; URS *et al.*, 2017). Dentre as classes mais importantes de proteases, podem ser vistas as serinoproteases e cisteinoproteases. Fernandes *et al.* (2015), observaram que no látex de *Plumeria pudica*, existia a ação de proteases cisteínicas e serínicas, sugerindo que o envolvimento destas duas classes de proteases, conferia atividade anti-inflamatória e antinociceptiva ao composto testado.

Flavonoides e terpenóides, são classes de moléculas reconhecidas por seu potencial anti-inflamatório, componentes geralmente descritos com o processo, tanto *in vivo* como *in vitro*, suas propriedades são bastante descritas na literatura, porém o mecanismo de ação destas moléculas ainda não está bem elucidado. Acredita-se que seu alvo farmacológico são moléculas que compõem este sistema, como inibição de eicosanoides, e síntese de enzimas, fos-

folipases, ciclooxigenases (COXs) e lipooxigenases, além da inibição por outros mecanismos, histamina, proteino-quinases e ativação de transcriptases (RIBEIRO *et al.*, 2018).

2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PLANTAS LATICÍFERAS

É notável o crescente número de estudos publicados que relacionam a utilização de produtos à base de plantas para fins medicinais, uma vez que todos os seus componentes podem ser utilizados, com isso estudos que se concentram na utilização do látex e moléculas presentes nesse composto vêm estando cada vez mais presentes (PAUDEL; ADHIKARI; DAS, 2018). Por ser um produto de interessante utilização terapêutica, e por contemplarem diferentes atividades biológicas, dentre elas, atividade anti-inflamatória (SALIM *et al.*, 2018), analgésica (FERNANDES *et al.*, 2015), antitumoral (KERCHE SILVA, 2017), antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2018).

A atividade anti-inflamatória do látex de *Euphorbia helioscopia* foi investigada, por meio de modelo inflamatório, o método escolhido para realização do experimento, foi o ensaio de edema de pata induzido através do agente químico carragenina, em camundongos albinos. Meia hora antes da administração da amostra, os animais receberam injeções de 0,05 mL de carragenina à 5%, em suas superfícies plantares, na pata traseira direita. O tratamento dos animais foi realizado através de três doses do látex (100, 200 e 300mg/kg) dissolvidos em água destilada, por via oral (*v. o.*) Os resultados demonstraram que o látex de *E. helioscopia* na concentração de 300mg/kg, apresentou melhores resultados possuindo atividade anti-inflamatória por inibir a síntese ou liberação de moléculas diretamente envolvidas com a resposta inflamatória, como ciclooxigenase e prostaglandina (SALEEM *et al.*, 2015).

Viana *et al.* (2017), descreveram como parte de estudo, as propriedades anti-inflamatórias de proteínas encontradas no látex de *Calotropis procera*, utilizando o modelo experimental de peritonite em camundongos. Os animais receberam 30 minutos antes de qualquer tratamento, injeção de carragenina (500mg/kg), por via intraperitoneal (*i. p.*) e decorridos este período, foram então tratados com a fração proteica do látex na dosagem de 2mg dissolvidos em 0,2mL de PBS/kg, via intraperitoneal (*i. p.*). O potencial biológico das proteínas encontradas no látex da planta, demonstrou ser altamente anti-inflamatória, diminuindo a infiltração leucocitária na cavidade peritoneal dos animais, e sendo capaz de reduzir o processo inflamatório, por agir diretamente em vias de produção/liberação de óxido nítrico (NO), atuando diretamente na atividade da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS).

2.4 GÊNERO PLUMERIA L. E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Plantas do gênero *Plumeria spp.* são pequenas árvores, decíduas, com significativo valor medicinal entre as populações asiáticas, nativas de países tropicais, possuem folhas geralmente de coloração verde brilhante, comumente ovaladas, flores tubulares em aspecto de “cata-vento” compostas por cinco pétalas, variando em suas colorações de brancas, vermelhas, amarelas ou rosadas (DE CARVALHO *et al.*, 2014; CHOLIQ *et al.*, 2017; LEILEI *et al.*, 2018).

Plantas da espécie *P. pudica*, são árvores decíduas, pertencentes à família Apocynaceae, conhecidas popularmente como “buque de noiva”. São plantas tipicamente ornamentais, popularmente encontradas em grande parte da América do Sul, impressionam pelo branco de suas flores e por seu longo período de florescência (Figura 1) (FERNANDES *et al.*, 2015; SUAREZ *et al.*, 2017; SUGIYAMA *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2018). Esta espécie de planta é bastante conhecida por seus valores religiosos e cosméticos em países asiáticos, além de demonstrar interessante potencial para ser usada como agente ao combate de infecções e doenças digestivas (PRASAD *et al.*, 2016).

Chattopadhyay *et al.* (2017), descreveram o potencial antioxidante de extratos metanólicos de folhas de *P. alba*, para capacidade de inibição na formação de biofilme microbiano *in vitro*. Os ensaios de inibição da formação de biofilme foram avaliados através da técnica de formação de biofilme em microplaca, onde o microrganismo, *Pseudomonas aeruginosa*, foi isolado visando crescimento. Como resultados obtidos, *P. alba* apresentou resultados interessantes para inibição da formação do biofilme de *P. aeruginosa*, em cerca de $90,30 \pm 0,27\%$, entretanto, os autores conseguiram somente demonstrar atividade bacteriostática apresentada pelos extratos.

Em outro momento, Lotankar *et al.* (2016), avaliaram a atividade anti-inflamatória de *P. Obtusa*. Seu potencial anti-inflamatório foi avaliado utilizando dois modelos de teste em animais: método de “cotton pellet” e edema de pata induzido por carragenina, em ratos machos *Wistar*. Foram testados extratos etanólicos da casca da planta, nas doses de 100, 200 e 400mg/kg. Como resultados os autores observaram que o extrato etanólico da planta demonstrou inibição para formação do edema, sendo que a dose de 400mg/kg, apresentou resultados mais significantes em relação ao granuloma inflamatório formado pelo modelo “cotton pellet”, o extrato nas doses de 200 e 400mg/kg demonstrou boa resposta com alta anti-granulação (20,61% e 33,24%), quando comparados a grupo que recebeu a droga padrão para o tratamento, indometacina (31,91%).



Figura 1. Planta *Plumeria pudica*. (A) Aspecto geral da planta *P. pudica*. (B) Fruto típico da espécie. (C) Folha em formato de “colher”. (D) Flor de coloração esbranquiçada com fauce amarelada. Fonte: Próprio autor.

Para ensaios experimentais utilizando Proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp), o produto demonstrou inibir o processo inflamatório e respostas nociceptivas, por diminuição da ação de mediadores inflamatórios e citocinas pro-inflamatórias (FERNANDES *et al.*, 2015). Para avaliação de possível atividade anti-inflamatória, os autores realizaram ensaios utilizando modelos experimentais como, edema de pata induzido por carragenina ou dextrana e

modelo de peritonite em animais (camundongos Swiss, *Mus musculos*). Em pré-tratamento realizado nos animais, PLPp na dose de 40mg/kg conseguiu reduzir o edema de pata por carragenina, dextrana, serotonina, histamina e prostaglandina E2. A inibição do edema por carragenina apresentou-se por redução na atividade de mieloperoxidase. PLPp reduziu migração leucocitária no peritônio dos animais induzida por carragenina, com consequente diminuição de citocinas pro-inflamatórias no fluido peritoneal. A fração conseguiu diminuir contrações abdominais induzidas por ácido acético e a primeira fase do modelo de lambadura na pata dos animais induzidas por formalina. PLPp quando aquecida a 100° C, por 30 minutos, apresentou perda significativa da atividade anti-edematogênica e de mieloperoxidase, demonstrando envolvimento de proteínas termolábeis com efeito anti-inflamatório.

Recentemente estudos foram publicados, utilizando o látex de *P. pudica* como possível produto com atividade terapêutica. Santana *et al.*, (2018), avaliaram o potencial antidiarreico de uma fração dialisável desta planta (PLPp), os testes foram realizados através de modelos por indução de diarreia aguda em animais por óleo de rícino. Utilizando camundongos Swiss (*Mus musculus*), testes como motilidade gastrointestinal, *enteropooling* e marcadores de estresse oxidativo foram realizados. O pré-tratamento intraperitoneal (*i. p.*) dos animais com a fração PLPp na dose de 40mg/kg apresentou resultados significantes para inibição de fezes diarreicas, seguido por diminuição no acúmulo de líquidos e trânsito intestinal, além de impedir alterações nos níveis de moléculas importantes dentro do sistema antioxidante como, glutathiona reduzida (GSH) e ácido malondialdeído (MDA).

O efeito protetor de proteínas encontradas no látex de *P. pudica*, foi avaliado na colite induzida por ácido acético em animais, estudo descrito por, Oliveira (2018). A colite experimental – foi induzida por administração de 200µL de ácido acético a 6% via transretal nos animais. O pré-tratamento destes animais foi realizado utilizando diferentes concentrações de proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp), nas doses de 10, 20 e 40mg/kg, via intraperitoneal (*i. p.*). PLPp 40mg/kg apresentou os melhores resultados, demonstrando diminuir significativamente o peso úmido dos cólons dos animais, reduzindo os escores macroscópicos e microscópicos de lesão. A fração proteica conseguiu reduzir ainda de forma significativa, a atividade de mieloperoxidase (MPO) e concentrações de IL-1β, uma citocina pro-inflamatória, evidenciando os efeitos anti-inflamatórios de PLPp. Além disso, a fração proteica do látex conseguiu promover proteção, estabilizando níveis de moléculas envolvidas diretamente com o mecanismo de estresse oxidativo (GSH e MDA).

Em paralelo, foi verificado o grau de toxicidade encontrada na fração do látex de *P. pudica* (PLPp), em camundongos (SOUZA, 2018).

Os animais receberam doses diárias de PLPp 40mg/kg por via intraperitoneal (*i. p.*) durante 10 e 20 dias consecutivos, para avaliação de toxicidade aguda e subcrônica respectivamente. Avaliações de perfis comportamentais, hematológicos e bioquímicos foram observados nos animais, juntamente com determinação de DL50 para presença de sinais clínicos ou morte, verificada em duas doses (300 e 2000mg/kg). Os resultados demonstraram que PLPp foi capaz de elevar significativamente os níveis de AST, mas não elevando níveis de ALT, creatinina e ureia. Os níveis de GSH, MDA e MPO em animais tratados com a fração não apresentaram diferença significativa verificadas nos tecidos. A fração proteica não apresentou letalidade nas doses de 300 e 2000mg/kg, entretanto foi observada diminuição de atividade geral, dificuldade de locomoção, perda de reflexos auriculares e visuais, além de irritabilidade, principalmente na dose de 2000mg/kg. Estes resultados demonstraram que PLPp apresentou baixa toxicidade.

Estes achados demonstram o potencial farmacológico de PLPp, abrindo um leque de novas possibilidades e investigações promissoras neste material.

2.5 PERIODONTO

O periodonto é descrito como, estruturas de tecido conjuntivo, revestidos por tecido epitelial, seu desenvolvimento ocorre durante o crescimento e formação dos dentes, no período embrionário (PORTO & BARBOSA, 2018). Um tecido periodontal em condições normais e saudáveis apresenta gengiva em coloração rosada (dependendo da pigmentação da pele), superfície seca, com gengiva papilar preenchendo o espaço interdental, profundidade de sulco igual ou menor que 3mm com consistência firme (figura 2) (PEREIRA & SOUZA, 2018).

Microscopicamente o periodonto é formado por três tipos diferentes de epitélio, o epitélio oral, sucular e juncional, onde o epitélio oral tem por continuidade o epitélio da cavidade oral, o sucular adjacente ao dente, entretanto, não conecta ou se liga a superfície do dente e o juncional se apresenta em íntimo contato com o dente (PALUMBO, 2017).

O periodonto pode ser dividido em periodonto de proteção, que compreende a lâmina própria da gengiva, a qual são encontradas, gengiva marginal ou livre e inserida; e o periodonto de sustentação que corresponde estruturas como, osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal (VARONI *et al.*, 2017; PINHEIRO & RODRIGUES, 2017).

A gengiva marginal ou livre é composta por tecidos gengivais interproximais denominados, papilas gengivais ou papila gengival interproximal, sua forma é determinada por contato entre os dentes e pelo contato da junção cimento-esmalte (SILVA & PONCETI,

2017). A gengiva inserida por sua vez, apresenta uma complexa rede de capilares e vênulas em sua lamina própria, devido a existência de uma grande microvascularização nessa região, pode ser observado grande quantidade de exsudato durante processos inflamatórios (KATCHBURIAN & ARANA, 2004).

O ligamento periodontal é uma rede fibrosa alinhada e conectada firmemente ao cemento em um lado do dente e ao osso alveolar da maxila no outro lado, atua como amortecedor para distribuição de forças e consequente proteção dos dentes durante o processo de mastigação e função oclusal (JONG *et al.*, 2017; PALUMBO *et al.*, 2017).

O cemento pode ser descrito como um tipo específico de tecido conjuntivo mineralizado capaz de recobrir superfícies anatômicas das raízes dentárias, auxilia na ancoragem do ligamento periodontal que se estende até o osso alveolar, pode ser classificado em cemento intermediário (junção cimento-esmalte), acelular (porções coronárias e médias das raízes) e celular (porções apical e inter-radicular da raiz) (ARZATE; ZEICHNER-DAVID; MERCADO-CELIS, 2015; CROSSMAN *et al.*, 2018).

Osso alveolar juntamente com o ligamento periodontal, constitui um sistema de ancoragem do dente ao alvéolo, presença de fibras colágenas perpendiculares a superfícies, denominadas fibras de Sharpey, conferindo a esta estrutura, aspecto fasciculado (PORTO; BARBOSA, 2018).

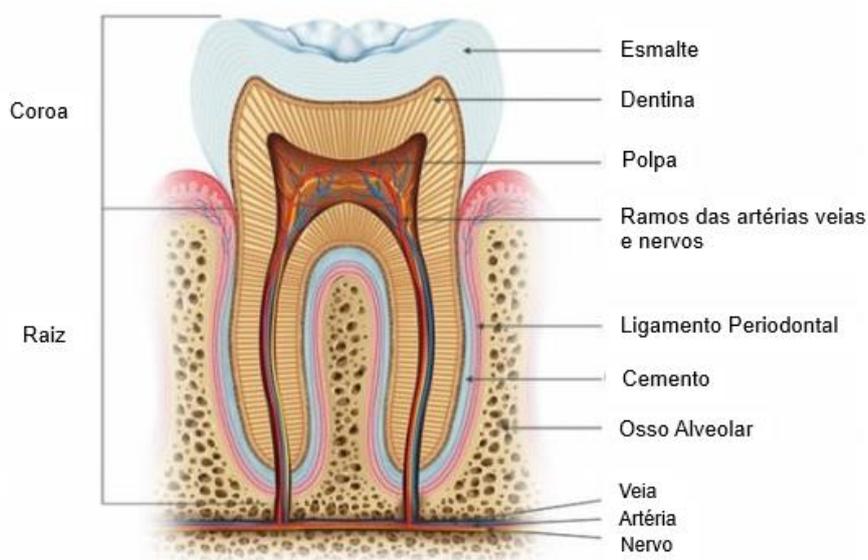


Figura 2. Anatomia do periodonto. Fonte: <http://www.coriodontologia.com/endodncia/>

2.6 PERIODONTITE

No que se refere a cavidade oral, gengivite e periodontite podem ser exemplos citados de patologias ocasionadas Ao grande acúmulo de biofilme bacteriano sob a forma de placa dentária supragengival ou subgengival (SHAWN *et al.*, 2016).

A periodontite é uma doença comum e destrutiva da cavidade oral, que leva a perda óssea alveolar e de fibras periodontais, manifestando intenso processo inflamatório, com consequente perda das estruturas de proteção e suporte dentário, podendo ser irreversível, induzida por acúmulo e formação de placa bacteriana (Figura 3) (CHRYSANTHAKOPOULOS, 2016; PESSOA *et al.*, 2018; RICUCCI *et al.*, 2018).



Figura 3. Ilustração da periodontite agressiva. Fonte: <https://www.corsodyl.co.uk/gum-disease/stages/what-is-periodontitis/>

É relatado associação da periodontite com as mais variadas espécies de microrganismos, *actinomyces actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, e *Tannerella denticola*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, dentre muitos outros que estão envolvidas diretamente com a instalação da doença em tecidos orais, demonstrando haver um mecanismo de simbiose por parte desta comunidade microbiana. (LIU *et al.*, 2014; LALLIER *et al.*, 2015; HAJISHENGALLIS, 2015).

Além de ser um fator preponderante que influência no bem estar-social do indivíduo e em sua qualidade de vida, a periodontite destrutiva, afeta milhares de pessoas ao redor do mundo. Acredita-se que 10 a 15% da população mundial seja afetada pela periodontite agressiva, estimou-se que entre os anos de 2009 a 2014, 42,2% da população adulta norte-

americana até os 30 anos, apresentam ou já apresentaram quadros variantes de Periodontite de severa a moderada e que na América Latina a prevalência chegou a corresponder um total de 20,4% apenas no ano de 2010. No Brasil em 2014 os índices estatísticos demonstraram valores significantes de 19,4 % prevalentes em adultos entre 35 e 44 anos de vida (D'AVILA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2014; EKER *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2018; HEIKKILA *et al.*, 2018).

Diversos são os fatores que podem levar ao surgimento da periodontite, por isso ela pode ser descrita como uma doença multifatorial, entre eles, fatores genéticos ambientais, socioeconômicos, má higienização bucal, raça e utilização de tabaco (HE *et al.*, 2017; HEIKKILA *et al.*, 2018).

A presença de biofilme bacteriano na superfície dentária promove reações imuno-inflamatórias nos tecidos de suporte periodontal que podem resultar no desenvolvimento da periodontite, e a presença de alguns fatores de risco podem modificar as características clínicas e progressão da doença. (PAVONE *et al.*, 2015). A periodontite apresenta uma significativa associação com doenças sistêmicas prevalentes, suas condições clínicas estão interligadas com a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), alterações renais, prevalência de Diabetes mellitus (DM) e doenças cardiovasculares, isso tudo em decorrência de moléculas pro-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs), que são transportadas para os órgãos, via circulação sistêmica (FRANÇA *et al.*, 2017; MODH *et al.*, 2017; BECK *et al.*, 2018; PATHAK & MAHANTA, 2018; RATHOD *et al.*, 2018).

Alguns estudos tentam observar se os efeitos da periodontite podem estar diretamente ligados aos efeitos adversos em diferentes tecidos (efeitos sistêmicos), devido a liberação de moléculas conhecidas como marcadores de lesão tecidual. Em estudos realizados, foi visto que para níveis de moléculas hepáticas, a periodontite não apresenta elevações significantes nas transaminases (AST e ALT) no soro de indivíduos comprometidos com a doença (KUROKI *et al.*, 2018, PESSOA *et al.*, 2018, WIDITA *et al.*, 2018). França *et al.*, (2017) investigaram possíveis alterações renais, através de marcadores de função (ureia e creatinina) e por meio de análises histopatológicas, onde foi confirmado o envolvimento da doença com alterações neste órgão.

Os microrganismos presentes nas superfícies dos dentes relacionam a periodontite com envolvimento de resposta inflamatória intensa, através do recrutamento de células polimorfonucleares que estimulam a liberação de mediadores pro-inflamatórios, como diferentes classes de interleucinas (IL-1b, IL-17), TNF- α e quimiocinas para os sítios afetados, outras moléculas sinalizadoras como espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas proteolíticas,

que em altos níveis são responsáveis por ocasionar destruição tecidual; além de ativar diretamente vias ligadas a reabsorção óssea, como a RANK/RANKL/OPG (DA SILVA *et al.*, 2016; FREIRES *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018).

2.7 PERIODONTITE E POSSÍVEIS EFEITOS SISTÊMICOS

A relação entre a periodontite desencadeada por microrganismos patogênicos orais e a aquisição de outras doenças vem sendo bastante discutidas no meio científico (CALDERARO *et al.*, 2016). Moléculas liberadas pelos periodontopatógenos ou durante os processos imunogênicos, acabam por seguir via circulação sistêmica se depositando nos mais diferentes órgãos acarretando agressões estruturais aos mesmos (PATHAK & MAHANTA, 2018).

Alguns autores relacionam a periodontite com a susceptibilidade de um indivíduo ter comprometimento a nível hepático, desenvolvendo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGN), em pacientes com esta doença foi visto que o tratamento direcionado para a periodontite foi capaz de reduzir níveis séricos de aminotransferases, outros estudos já demonstram que a relação entre carga oral bacteriana pode estar associada com progressão acelerada de cirroses (PESSOA *et al.*, 2018; HELENIUS-HIETALA *et al.*, 2019.)

Diferentes estudos já relacionam, disfunções endoteliais ocasionadas por moléculas liberadas por patógenos periodontais, como causadores de quadro típicos de doenças renais crônicas (DRC), onde com a redução de carga desses patógenos por meio de tratamento, demonstrou melhorar a função renal, entretanto alguns estudos tornam esses dados contraditórios, sendo insuficientes para considerar essas evidências (FANG *et al.*, 2015; DESCHAMPS-LENHARDT *et al.*, 2019).

2.8 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA PERIODONTITE

No que se refere ao tratamento da periodontite, são ofertadas terapias invasivas cirúrgicas e não cirúrgicas, que objetivam a retirada do biofilme bacteriano da superfície dentária, técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, foram desenvolvidas na tentativa de diminuição do trauma pós-operatório, além de apresentarem maiores vantagens em reduzir os níveis de inserção clínica e profundidade de sondagem (MAIOLA *et al.*, 2015; RIOS *et al.*, 2015).

Atualmente o tratamento convencional utilizado na clínica odontológica para tratar periodontite, consiste na raspagem mecânica e alisamento radicular (RAR) que visam reduzir a carga intra-oral de microrganismo e na pior das hipóteses, a extração do dente, após

administração de anestesia local, juntamente com a utilização de diferentes antibióticos de amplo espectro locais ou sistêmicos, para evitar recidivas, todos estes processos gerando altos custos dentro do setor público (TONETTI *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2014; AKHALWAYA; VUUREN; PATEL, 2018; BUNTE; HENSEL; BEIKLER, 2018).

Um dos fatores primordiais para o tratamento da periodontite é o controle rigoroso da quantidade de microrganismos existentes nos tecidos subgingivais, todos os pacientes são instruídos a adotar práticas de higienização bucal adequada, sendo as mais básicas, como escovação regular e periódica (LISS *et al.*, 2017).

2.8 PRODUTOS NATURAIS E A PERIODONTITE

Devido à crescente ineficácia de antibióticos orais de origem sintética utilizados na clínica odontológica, é gerada uma necessidade de alternativas preventivas, opções de tratamento e produtos voltados para as doenças orais, já que muitos microrganismos vêm adquirindo resistência a esses produtos e alguns destes produtos podem conter substâncias causadoras inclusive de efeitos adversos em pacientes (PALOMBO, 2011; DHINGRA, 2013; BUNTE; HENSEL; BEIKLER, 2018).

Os produtos vegetais podem ser considerados como uma importante fonte alternativa para o tratamento de doenças orais, devido aos seus componentes bioativos, e também por serem exemplos de drogas naturais como potenciais terapêuticos. (LAZAR; SAVIUC; CHIFIRIUC, 2016; HICKL *et al.*, 2018). O uso de produtos naturais como inibidores de biofilme é seguro e menos tóxico do que a utilização de produtos sintéticos. É notável a quantidade de espécies de plantas e/ou de substâncias extraídas de produtos naturais, que são utilizadas dentro da medicina tradicional popular para manutenção da higiene bucal, até mesmo em combate aos mais variados tipos de doenças bucais, devido estes produtos apresentarem ação microbiana e citotóxica, que estão direcionados principalmente à metabólitos secundários produzidos, tais como fenóis, taninos e flavonoides, e também devido suas atividades anti-patogênicas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2017; GUPTA & SHETTY, 2018).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o tratamento da doença periodontal. Mecanismos terapêuticos têm sido avaliados para redução do biofilme bacteriano, para controlar de forma efetiva, a progressão da periodontite (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Souza Filho *et al.* (2018), em estudo verificaram as propriedades anti-inflamatórias de um polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (P-GC), na doença periodontal induzida por ligadura em modelos animais, um produto natural originado de fonte renovável com possível atividade biológica. Os autores demonstraram aplicação tópica de P-GC na dose de 150mg,

reduziu significativamente a perda óssea alveolar, com diminuição da expressão de RNA mensageiro de moléculas como, TNF- α , IL-1 β , RANKL e RANKL/OPG envolvidas no processo de osteoclastogênese e baixa significativa na atividade de mieloperoxidase no tecido periodontal.

Hatipoglu *et al.* (2015), utilizando animais da espécie *Wistar*, demonstraram que extratos de *Crataegus orientalis* (espinheiro) quando administrado na dose de 100mg/kg orogastricamente, apresentaram possível potencial anti-inflamatório, através da redução da contagem de células relacionadas com o fenômeno inflamatório e pela baixa presença de infiltrado inflamatório em achados histológicos. O produto também promoveu redução significativa em níveis de antioxidantes totais e do estresse oxidativo, regulando estas moléculas, além de aumentar o número de osteoblastos teciduais indicando prevenção da perda óssea alveolar na periodontite experimental em ratos.

Extratos de *Matricaria recutita L.* (camomila) quando administrados por gavagem em ratos albinos, wistar, demonstraram prevenir o fenômeno de reabsorção óssea alveolar, impedindo a ativação de osteoclastos através da via de absorção RANKL-OPG, achados detectados por histometria, além de apresentar potencial anti-inflamatório, reduzido a infiltração neutrofílica e atividade de mieloperoxidase no periodonto, sendo também capaz de inibir moléculas pro-inflamatórias responsáveis pelo mecanismo, como TNF- α e interleucina 1 β (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Em estudo, Lima *et al.* (2017), avaliaram os efeitos de extratos de flores de *Calendula officinalis* (margarida) quando administrados de 2ml/kg ou 90mg/kg por gavagem, demonstrando reduzir o processo inflamatório e manter a eficácia normal do sistema antioxidante, causando redução significativa de GSH e aumento dos níveis de MDA gengivais além de preservar o tecido ósseo, quando avaliado por morfometria em modelos de periodontite experimental.

Teixeira *et al.* (2017), conduziram estudo experimental, utilizando fêmeas da espécie *Wistar*, onde submeteram ao procedimento experimental de periodontite, através de fio de nylon estéril. Os animais foram tratados via intraoralgástrica (gavagem) com extratos de *Stemodia maritima*, durante onze dias, como resultados obtidos, foi possível verificar redução em parâmetros inflamatórios, com citocinas e interleucinas, além de ser notado uma redução no mecanismo de estresse oxidativo, avaliado pela concentração de moléculas envolvidas no sistema, SOD e CAT, também foi vista redução na perda óssea alveolar.

Extratos da planta medicinal *Tocoyena sellowiana* (Cham & Schltldl) demonstraram reduzir a perda óssea alveolar em ratos submetidos a periodontite experimental por inibição

das ações de ciclooxigenase 2 (COX-2) e interleucina 1 β . Para indução da periodontite nos animais foi utilizado fio de nylon estéril, fixado na cérvice do segundo molar dos animais, anestesiados, os mesmos foram tratados com doses do extrato da planta via oral dissolvidos em solução de salina estéril (0,9%), nas dosagens de 0,1, 1 e 10mg/kg.

Estudos relataram algumas potencialidades farmacológicas, em proteínas do látex da planta *Plumeria pudica*, tais como atividade anti-inflamatória. As proteínas poderiam agir diretamente na diminuição da liberação e/ou síntese de mediadores inflamatórios. Esta propriedade pode ser interessante no estudo da doença periodontal, visto que essa doença, promove intenso processo inflamatório tecidual (RIBEIRO *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp 40mg/kg) na periodontite induzida por ligadura em ratos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a ação anti-inflamatória de PLPp (40mg/kg) por meio de avaliação macroscópica clínica através do Índice de sangramento gengival (ISG) e Índice de profundidade de sondagem (IPS);
- Mensurar atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival e hepático dos animais;
- Estudar os efeitos de PLPp (40mg/kg) sobre a perda Óssea Alveolar através de análise morfométrica;
- Avaliar os efeitos de PLPp (40mg/kg) na contagem total do número de leucócitos no sangue periférico de animais tratados;
- Verificar relação entre peso de órgãos e peso corporal dos animais;
- Investigar efeitos de PLPp (40mg/kg) sobre o estresse oxidativo em órgãos como o fígado e rim, por meio de dosagens dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) e concentrações de Ácido Malondialdeído (MDA);
- Dosar níveis de biomarcadores de injurias renais, ureia e creatinina e biomarcadores de danos hepáticos, aminotransferases, AST e ALT no soro sanguíneo dos animais tratados;
- Dosar biomarcadores sanguíneos (ácido úrico, albumina, cálcio, colesterol total, colesterol HDL, fosfatase alcalina e proteínas totais), para verificação de possíveis danos sistêmicos;

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Coleta do látex, realizou-se na cidade litorânea de Parnaíba, situada no extremo norte estado do Piauí. A planta foi identificada e sua exsicata depositada no herbário Delta do Parnaíba da Universidade Federal do Piauí, sob número 2432. Seu cadastro foi encontrado na plataforma SisGen com a numeração AD8514C. Coleta e processamento do material seguiram metodologia descrita por Santana *et al.*, (2018). Para obtenção do látex de *Plumeria pudica*, galhos da planta foram cortados, sendo coletado o produto fluído de secreção (látex). Na tentativa de minimizar o efeito natural, que é a coagulação do látex, o exsudato, coletou-se cerca de 10mL do látex, em tubos Falcon (capacidade de armazenamento de 50mL), previamente preenchidos com 10mL de água destilada (1:1 v/v). Após coleta, o material passou por centrifugação, durante período de 15 minutos a 3600rpm, para separação de fases sólida (borracha) e líquida (soro) do látex. O sobrenadante resultante do processo anterior descrito, transferiu-se para membranas de diálise com capacidade para retenção de partículas com massa molecular superior a 8kDa, e desprezou-se o precipitado, rico em borracha. O material foi submetido a diálise por 48 horas contra água destilada, realizando trocas intermitentes dessa água a cada 6 horas. Passado 48 horas o material passou por nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante obtido deste procedimento congelado, e logo após, liofilizado, o produto obtido por este processo foi utilizado durante os experimentos para o tratamento dos animais.

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para realização dos experimentos, utilizou-se ratos (*Rattus norvegicus* albinos, *Wistar*), fêmeas, adultas, com peso variante entre 190 a 240g, obtidos no Biotério central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais receberam alimentação e água *ad libitum*, acomodados em gaiolas plásticas e submetidos a ciclos de 12 horas com iluminação e 12 horas sem iluminação, em ambiente com temperatura variante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, durante o decorrer dos experimentos.

4.2.1. Critérios éticos

Os procedimentos de manejo dos animais realizaram-se de acordo com princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O presente estudo é um subprojeto que já foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), representado por número de protocolo 385/17 (Anexo I).

4.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE

Os animais foram submetidos à anestesia, utilizando soluções de 35mg/kg Ketamina/Dopalen® (Vetbrands, SP, Brasil) e 15mg/kg de Xilazina/Anazedan® (Vetbrands, SP, Brasil), via intramuscular (IM). Posteriormente seus pesos foram verificados em balança analítica, e em seguida acomodados em mesa operatória (baku), para início do processo de indução da doença periodontal (Figura 4). Com os animais anestesiados, realizou-se abertura bucal dos ratos, para facilitar a visualização e permitir acesso aos dentes molares inferiores da mandíbula de cada animal. O início do procedimento deu-se através do afastamento do primeiro e do segundo molar inferior, em ambos os lados (esquerdo e direito), para inserção do fio de nylon 3.0 (Procure®), utilizando agulha de fio de sutura. Envolveu-se o primeiro molar inferior com fio de nylon, acomodando no sulco gengival, realizando-se suturas simples de duplo reforço, nessa região, para fixação completa e segura do fio (Figura 5), conforme metodologia descrito por Vasconcelos *et al.*, (2017).

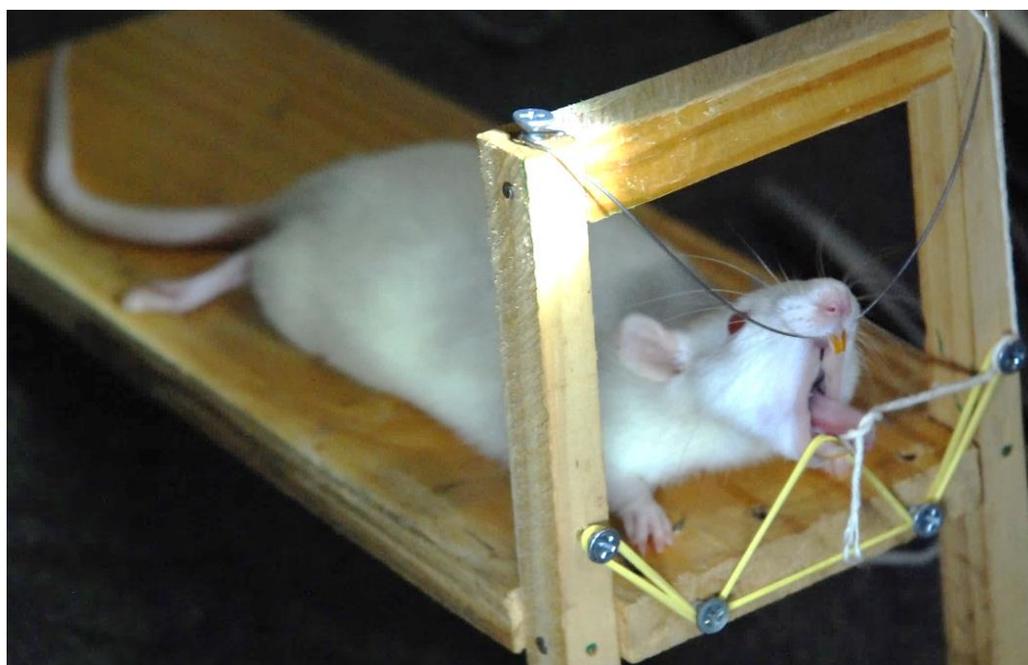


Figura 4. Mesa operatória para início do processo de indução da periodontite. Fonte: Próprio autor.



Figura 5. Procedimento inicial para induzir a periodontite. Fonte: Próprio autor.

4.4 TRATAMENTO

Os animais foram divididos em três grupos para realização do experimento: grupo controle negativo (saudável e sem indução), grupo periodontite (induzido e não tratado) e grupo PLPp (induzido e tratado), em uma média de oito animais por grupo.

Todos os animais do grupo PLPp foram tratados com a fração na dose de 40mg/kg, sendo esta dose estipulada de acordo com resultados positivos já vistos para atividade anti-inflamatória, observado por Fernandes *et al.* (2015). Solubilizou-se o material proteico em 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%), com aplicação realizada por via intraperitoneal (*i. p.*) como esquematizado na figura 6, durante 20 dias, diariamente, onde a quantidade de PLPp utilizada, estipulada de acordo com estimativas de peso diário dos animais.

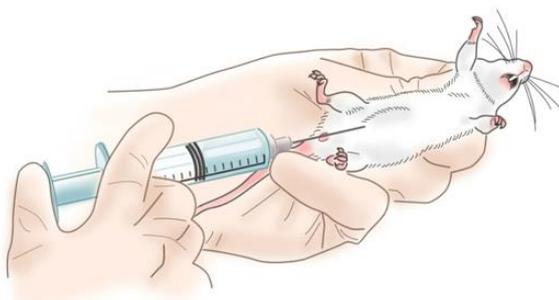


Figura 6. Esquematização do tratamento em ratos por via *i. p.* Fonte: <https://www.clodrosome.com/animal-injection/>

4.5 ANÁLISES MACROSCÓPICAS PARA AVALIAR INFLAMAÇÃO

4.5.1 Índice de Sangramento Gengival (ISG)

O Índice de Sangramento Gengival foi realizado por meio de sondagem do tecido gengival por dez segundo, utilizando sonda exploratória, sendo os resultados classificados de acordo com protocolo descrito por Liu *et al.*, (2014) da seguinte forma:

Tabela 1. Escores macroscópicos de inflamação

Escores	Margem gengival (MG) e Papila Gengival (PG)
0	Íntegra, saudável e sem sangramento
1	Leve inflamação, alteração em colorações, ausência de edema e sangramento localizado
2	Moderadamente inflamadas, alterações em coloração, presença de leve edema e sangramento presente no sulco gengival
3	Inflamação moderada, mudança de cor, presença de leve edema e sangramento presente no sulco gengival
4	Inflamação grave, mudança na coloração, presença de edema
5	Inflamação grave, mudança na coloração, edema presente e grave, ulcera e sangramento.

4.5.2 Índice de Profundidade de Sondagem (IPS)

Verificou-se a profundidade de sondagem através do uso de sonda milimetrada adaptada, como realizado Liu *et al.*, (2012).

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para definir Altura Óssea Alveolar (AOA), partindo da Junção Cimento-Esmalte (JEC) à Crista Óssea Alveolar (COA), as mandíbulas que foram conservadas em formaldeído 10%, após eutanásia dos animais, sendo limpas para retirada de tecido mole restante, e coradas utilizando azul de metileno a 1% (Dinâmica®, Diadema, São Paulo, Brasil).

Utilizando estereomicroscópico (LUPETEC®, MRP 09) com aumento através de objetiva de 30x, capturou-se imagens da altura óssea alveolar de cada hemimandíbula. Analisou-se as imagens em programa de computador específico, Image J (Media Cybernetics®, CA, USA), por 6 investigadores devidamente calibrados, para análise de AOA (Figura 7), medindo quatro pontos na face lingual. As medidas obtidas resultantes a partir do eixo da raiz, como se verifica abaixo:

- (1) AOA 1 – Distância verificada entre a altura da JEC até a COA, na porção mesial do primeiro molar inferior da mandíbula.
- (2) AOA 2 – Distância verificada entre a altura da JEC até a COA, na porção medial da raiz do primeiro molar inferior da mandíbula.
- (3) AOA 3 – Distância verificada entre a altura da JEC até a COA, na porção mediana da raiz intermediária do primeiro molar inferior da mandíbula.
- (4) AOA 4 - Distância verificada entre a altura da JEC até a COA, na porção mediana da raiz distal do primeiro molar inferior da mandíbula.

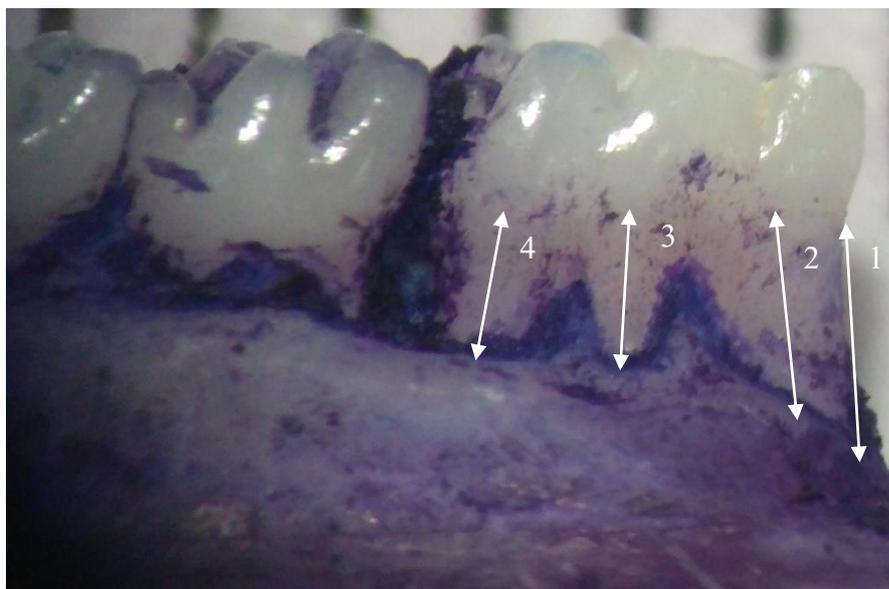


Figura 7. Medidas morfométricas da Altura Óssea Alveolar (AOA). Região correspondente a crista óssea alveolar (1) e porção mediana das raízes mesial (2), intermediária (3) e distal (4), face lingual do primeiro molar inferior em animais submetidos a periodontite experimental. Mandíbulas coradas por solução de Azul de Metileno 1%. Visualização em estereomicroscópio com aumento em objetiva de 30x.

4.7 RELAÇÃO ENTRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Com o auxílio de balança analítica foram verificados os pesos dos animais diariamente, sendo contado com primeiro dia, o dia de indução e o vigésimo dia, o dia de eutanásia dos animais.

4.8 RELAÇÃO ENTRE PESO DO ÓRGÃO POR PESO CORPORAL DE ANIMAL

Após eutanásia dos animais de todos os grupos, houve a retirada de os órgãos (fígado e rim) para posteriores análises, seus pesos úmidos foram verificados em balança analítica devidamente calibrada, sendo realizadas comparações entre peso dos órgãos de um respectivo animal com seu peso corporal relação feita entre todos os animais, em todos os grupos.

4.9 CONTAGEM TOTAL DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS

Colheu-se amostras sanguíneas oriundas do plexo retro-orbital (oftálmico) de cada animal, utilizando microtubos capilares. O sangue coletado em tubos próprios contendo solução de anticoagulante (EDTA) e em tubos de ensaio sem presença de anticoagulante para obtenção de soro, utilizados posteriormente para análises bioquímicas.

Após coleta, o sangue não coagulado foi utilizado para contagem total de leucócitos, seguindo procedimento de Carvalho, (1975), em tubo de ensaio foram pipetados 380 μ L de solução de Turk e adicionados 20 μ L de sangue (proporção de 1:20) com a solução homogeneizada, pipetou-se de 10 a 15 μ L da solução e colocados em câmara de Neubauer (0,100/0,0025 mm², SUPERIOR®, MARINFIELD, GERMANY). Os leucócitos foram contados a partir da visualização dos quatro quadrantes principais da câmara, sendo os resultados expressos em $n \times 10^6$ células (leucócitos) /mL de sangue periférico.

4.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.10.1 Avaliação de atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Para avaliação da atividade de MPO em tecidos, seguiu-se protocolo descrito por Bradley (1982). Logo após eutanásia dos animais, coletou-se porções gengivais de cada animal em ambos os lados anatômicos, com auxílio de lâmina de bisturi e do fígado dos animais. As amostras foram incubadas com solução de HTAB (Brometo de hexadecilmetilamônio) à 0,5% (50mg de tecido/mL) em tubos eppendorfs. Após incubação as amostras, sendo então homogeneizadas com auxílio de homogeneizador de tecidos celulares (PHD®, MTDHH4). O produto resultante do procedimento anterior, foi centrifugado em condições de 4000rpm, por 20 min, à 4°C. Com sobrenadante recuperado e posto em poços de placa de Elisa, marcados e identificados adequadamente, a atividade da enzima Mieloperoxidase teve mensuração em leitora de enzima-ligada ELISA (Leitora Touch Bioeasy®), utilizando absorvância de 450nm.

4.10.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Para a determinação dos níveis de glutathiona seguiu-se protocolo proposto por Sedlak & Lindsay (1968). Fragmentos de fígado e rim foram homogeneizados em solução de EDTA 0,02M, por meio de homogeneizador de tecidos celulares (PHD®, MTDHH4), após obtenção de homogenato a 10%, adicionou-se 320 μ L de água destilada, em alíquotas de 400 μ L do

homogenato completando o volume final com 80µL de ácido tricloroacético à 50%. O material foi centrifugado em condições de 3000rpm durante 15 minutos à temperatura de 4°C. Após centrifugação, coletou-se 400µL, acrescentando 800µL de solução tampão (Tris) (0,4M; pH 8,9) e 20µL de DTNB (0,01M) pesado 13,2mg de ácido nitrobenzoico para adição de 3,33mL de metanol, agitados por 3 minutos. As absorvâncias das amostras tiveram mensuração em comprimento de onda 412nm, por espectrofotômetro e os resultados obtidos expressos em µg de GSH por grama de tecido.

4.10.3 Determinação da concentração de Ácido Malondialdeído (MDA)

Para determinação da concentração de Ácido Malondialdeído, seguiu-se protocolo proposto por Mihara & Uchiyama (1978). Homogeneizando individualmente, fragmentos de tecidos correspondente, a fígado e rim, em homogeneizador de tecidos celulares (PHD®, MTDHH4), com solução gelada de KCl a 1,15% para preparo de 10% do homogenato. A seguir, adicionou-se alíquotas de 250µL do homogenato em tubos contendo 1,5mL de H₃PO₄ e 0,65µL da solução de ácido tert-butil (butanol) à 0,6%. Os tubos foram aquecidos em banho de água, com temperatura de 100°C, imediatamente logo após, resfriou-se a mistura por meio de banho de água gelada, para efeito de “choque térmico” e posteriormente adicionando-se 2mL de n-butanol. As amostras foram agitadas durante 1 minuto, sendo submetidas a centrifugação sob refrigeração (4° C) à 3000rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante recuperado teve absorvância mensurada em comprimentos de onda de 520 e 535nm, sendo que a partir da diferença da absorvância nas duas leituras, obteve-se os valores. Os resultados sendo expressos por nmol/g de tecido.

4.10.4 Dosagem de Ureia sérica

Através de protocolo previamente descrito, contido na embalagem do kit Labtest® Ureia, mediu-se a quantidade de ureia no soro sanguíneo dos animais de cada grupo (grupo controle, periodontite e PLPp), 100µL de soro animal foram adicionados em tubos de ensaio, juntamente com 1mL de uréase tamponada, a mistura teve de ser incubada em banho-maria a 37° C, durante 5 minutos. Após 5 minutos, adicionou-se 1mL de oxidante de uso e a absorvância do teste determinada por espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 600nm. Os resultados expressos a partir do seguinte cálculo:

$$\text{mg/dL} = \text{Absorvância do teste} / \text{Absorvância do padrão} \times 70$$

4.10.5 Dosagem de Creatinina sérica

Para dosagem de creatinina, verificou-se protocolo contido no kit comercial bioquímico (Labtest®, MG, Brasil) específicos para creatinina. Pipetou-se 250µL de soro animal em tubos de ensaio, juntamente com 2mL de tampão (reagente nº 2) e 500µL de ácido pícrico (reagente nº 1). Aqueceu-se mistura em banho-maria, durante 10 minutos, à 37°C. Para determinação de absorvância utilizou-se espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda de 510nm, sendo esta determinação entendida como primeira leitura, e o valor de absorvância resultante, descrito como A₁.

Após primeira leitura, adicionou-se 100µL de solução acidificante (reagente nº 4) a mistura, deixando-se repousar em temperatura ambiente, durante 5 minutos. Uma segunda leitura foi realizada no mesmo comprimento de onda anteriormente descrito (510nm), sendo a absorvância do teste descrita como A₂. Resultados obtidos através da equação:

$$\text{Creatinina (não corrigida)} = A_1 - A_2 / \text{Absorvância do padrão} \times 4,00 \text{ mg/dL}$$

4.10.6 Dosagem de AST e ALT no soro sanguíneo

Para dosagens de aminotransferases (AST e ALT), seguiu-se protocolo descrito via bula contido em kits bioquímico comercial (Labtest®, MG, Brasil), específico para AST e ALT, contidos na caixa dos reagentes. Para preparação do reagente de trabalho, adicionou-se quantidades específicas de reagente nº 1 ao reagente nº 3; 100µL do reagente de trabalho, foram adicionados a tubos de ensaios contendo 80µL de soro animal, colocou-se a mistura em banho-maria, durante 10 minutos em temperatura de 37°C, passados os 10 minutos, adicionou-se 200µL de reagente nº 2. Realizada leitura em espectrofotômetro utilizando absorvância de 340nm.

4.10.7 Dosagem de marcadores bioquímicos séricos

Realizou-se dosagens de marcadores bioquímicos dos animais, utilizados kits específicos para tais, como ácido úrico, albumina, cálcio, colesterol total e HDL, fosfatase alcalina e proteínas totais, todos os procedimentos seguiram protocolos descritos vide bula, (Labtest®, MG, Brasil), de acordo com os respectivos kits.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análises de dados estatísticos, em todos os experimentos foram calculadas as médias \pm EPM de certo número de eventos (n) em cada grupo. Diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias feita por meio do teste de *Student-Newman-Keuls* ou Turkey's, para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn's para dados não paramétricos. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Os dados foram plotados e por fim analisados em programa GraphPad Prism versão 7.0®.

5. RESULTADOS

Após 20 dias de indução periodontal, foram realizadas análises macroscópicas clínicas do tecido gengival, dos molares inferiores direito e esquerdo de cada animal dos grupos, demonstrando a presença de biofilme bacteriano aderido às áreas em que continham as ligaduras, com presença de aspecto inflamatório. Através de análise macroscópica, utilizando sonda milimetrada adaptada, foram identificadas presenças de pequenas úlceras, com pontos hemorrágicos, presença de focos inflamatórios e edema severo em animais não tratados (Figura 8B). Em achados vistos para o grupo controle negativo, não foi visualizado nenhum aspecto inflamatório, como esperado (Figura 8B), animais com PLPp apresentaram pouca formação de biofilme (Figura 8C), contudo, os parâmetros inflamatórios só poderão ser avaliados a partir dos testes específicos (ISG e IPS).

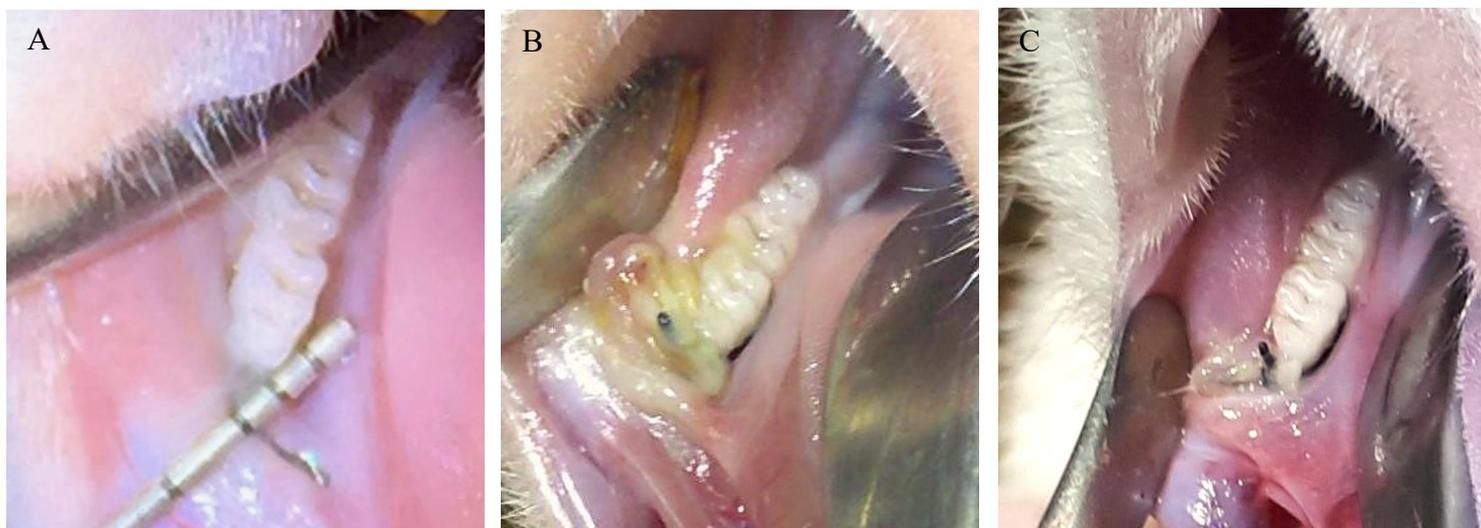


Figura 8. Visualização macroscópica do molar inferior direito de animais. (A) Animal saudável. (B) Animal induzido e não tratado. (C) Animal induzido e tratado com PLPp (40mg/kg), após 20 dias. Fonte: Próprio autor.

5.1 ÍNDICE DE SANGRAMENTO GENGIVAL (ISG)

O grupo periodontite apresentou altos valores referentes a este parâmetro ($2,7 \pm 0,08$ mm), quando comparado aos animais do grupo controle negativo ($0,1 \pm 0,07$ mm), por sua vez animais tratados com PLPp (40mg/kg), apresentando reduções estatisticamente significativas para os valores de ISG ($1,9 \pm 0,2$ mm). Dados apresentados na figura 9.

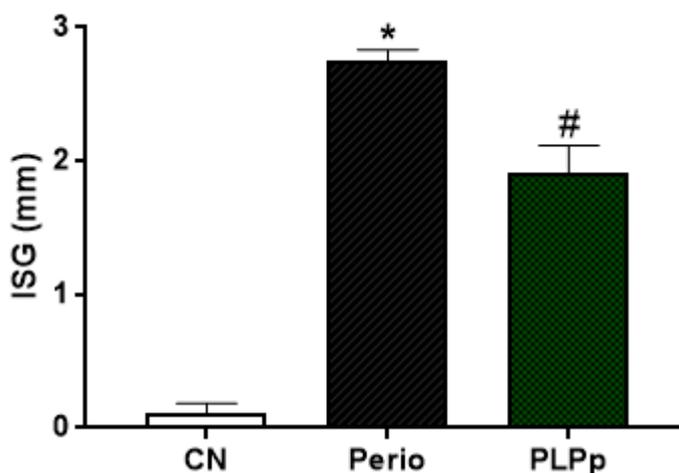


Figura 9. Efeito de PLPp sobre o Índice de Sangramento Gengival – ISG. * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados descritos como média \pm E.P.M. de oito animais por grupo. Kruskal-wallis seguido por teste de Dunn's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.2 ÍNDICE DE PROFUNDIDADE DE SONDAGEM (IPS)

Resultados para IPS encontram-se apresentados na figura 10. Animais pertencentes ao grupo periodontite sem tratamento, apresentaram valores estatisticamente elevados ($2,1 \pm 0,1$ mm), quando comparados aos valores vistos em animais do grupo controle negativo ($0,6 \pm 0,04$ mm). Em contrapartida, o grupo tratado com a fração proteica PLPp (40mg/kg), demonstrou redução significativa nos valores referentes ao parâmetro avaliado ($1,6 \pm 0,2$ mm).

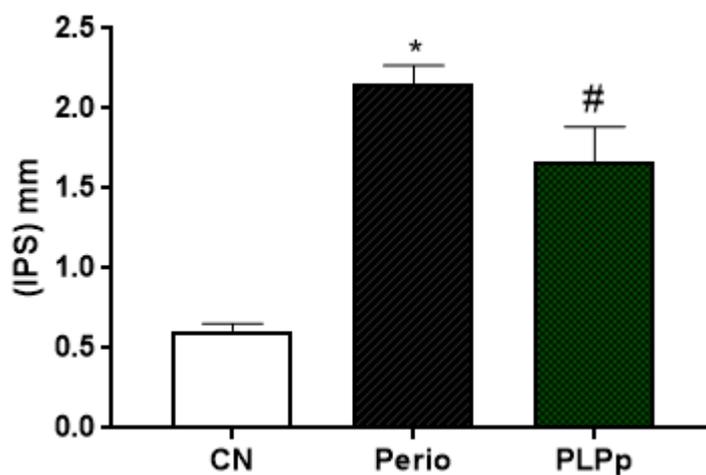


Figura 10. Efeito de PLPp sobre o Índice de Profundidade de Sondagem – IPS. * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados descritos como média \pm E.P.M. de oito animais por grupo. Kruskal-wallis seguido por teste de Dunn's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.3 MENSURAÇÃO DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para resultados observados na mensuração de MPO no tecido gengival, o grupo periodontite apresentou expressivas elevações ($10,7 \pm 1,3$ U/mg de tecido), quando comparados a animais sadios (grupo controle negativo) ($2,7 \pm 0,6$ U/mg de tecido). Por sua vez PLPp (40mg/kg), conseguiu reduzir a atividade enzimática no tecido gengival dos animais tratados, de maneira significativa, $p < 0,05$, apresentando valores estatisticamente baixos ($3,43 \pm 0,7$ U/mg de tecido), como visto na figura 11A. Entretanto, quando a mensuração enzimática foi realizada no tecido hepático dos animais, resultados para o grupo tratado com a fração proteica não diferiram estatisticamente dos demais, não havendo redução de modo eficiente para a quantidade enzimática neste tecido (Figura 11B).

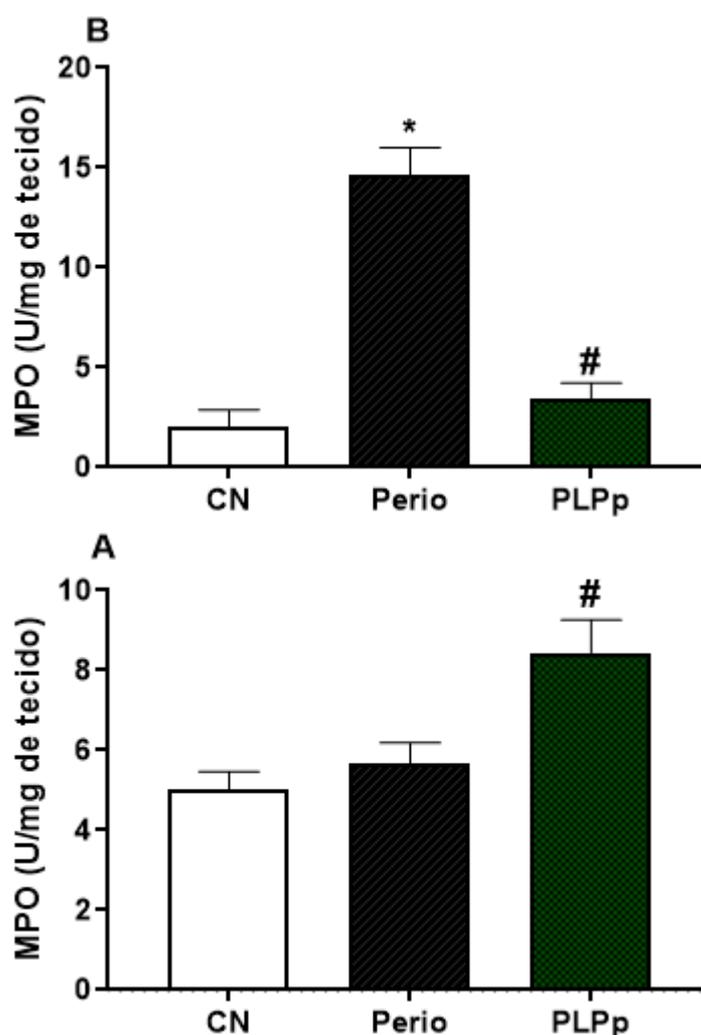


Figura 11. Mensuração de MPO no tecido gengival (A) e hepático (B). * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ALTURA ÓSSEA ALVEOLAR (AOA)

O processo de indução da periodontite experimental deu-se durante 20 dias consecutivos. Dentre todas manifestações clínicas, foi notado uma perda significativa de tecido de suporte dentário, levando a perda óssea alveolar. Para dados estatísticos o grupo periodontite apresentou elevados índices de altura óssea alveolar ($5,3 \pm 0,1$ mm). Valores para o grupo controle negativo apresentaram-se estatisticamente baixos ($2,9 \pm 0,05$ mm), $p < 0,05$, em animais tratados com PLPp (40mg/kg), foi observado de modo significativo a preservação da AOA, apresentando redução destes valores ($4,7 \pm 0,2$ mm) para este parâmetro quando comparado ao grupo periodontite. Os dados podem ser observados na figura 12.

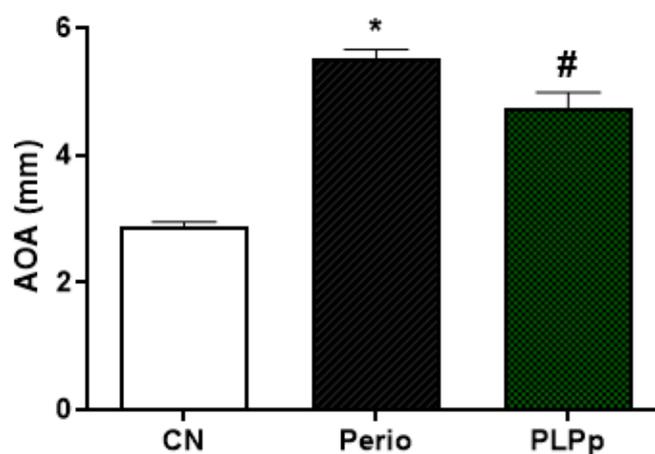


Figura 12. Altura Óssea Alveolar (AOA). * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.5 RELAÇÃO ENTRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados durante os dias de tratamento do experimento de periodontite. Seus pesos foram verificados no dia da indução da doença (primeiro dia de tratamento) e consecutivamente durante os dias de tratamento. Resultados dos pesos estão apresentados na figura 13.

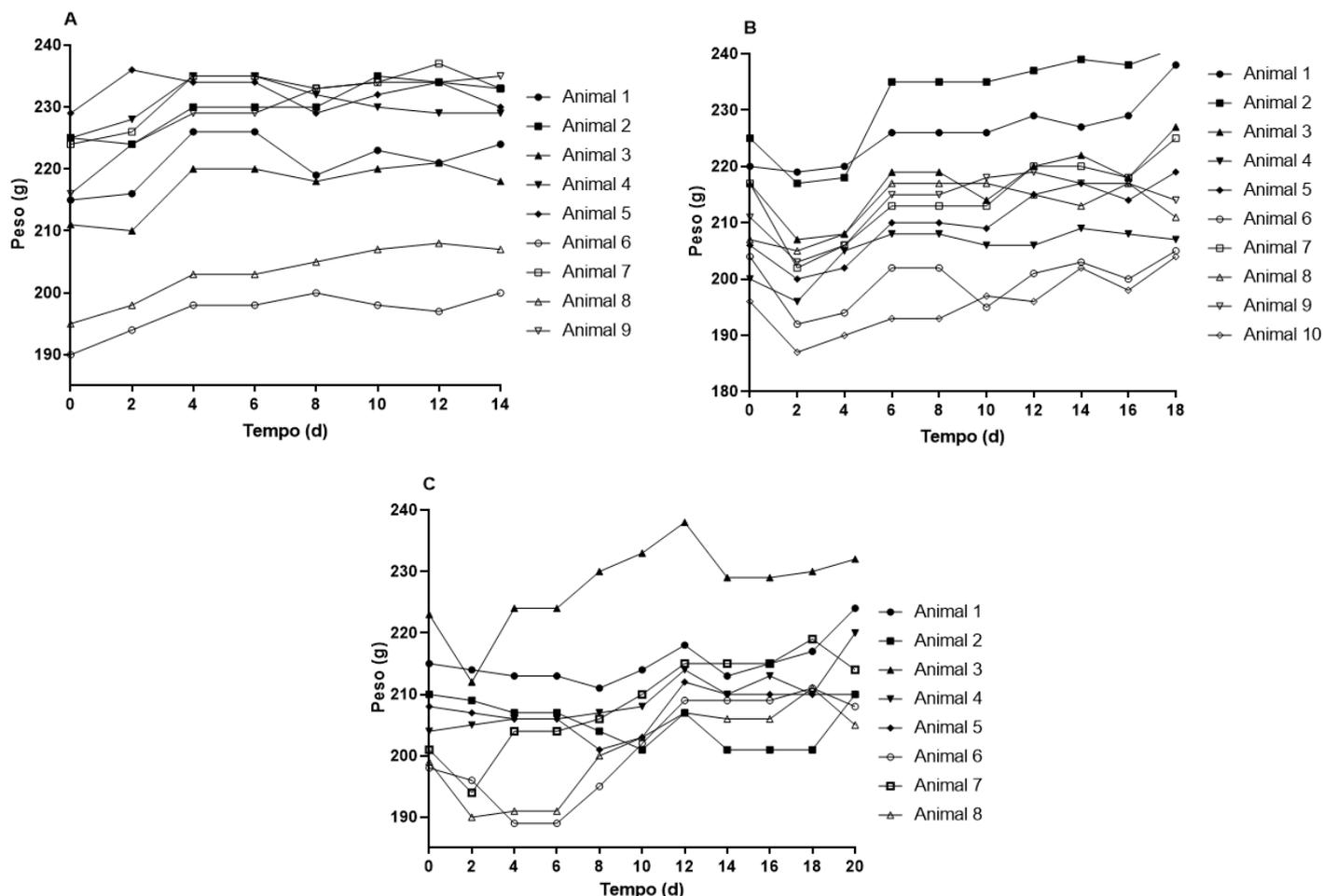


Figura 13. Variação do peso de animais. (A) grupo controle verificado por 14 dias. (B) grupo periodontite, verificado por 18 dias. (C) grupo tratado, verificado durante 20 dias. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA seguido de teste *Student-Newman-Keuls*.

5.6 RELAÇÃO ENTRE PESO DO ÓRGÃO POR PESO CORPORAL DE ANIMAL

Após eutanásia, o fígado e os rins de cada animal dos grupos envolvidos foram retirados e seus pesos úmidos verificados. Os valores dos pesos de órgãos dos animais de cada grupo (controle negativo, periodontite e PLPp), estão representados na tabela 2. Diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos três grupos envolvidos com o experimento, porém não foram consideradas significantes, $p > 0,05$. Com isso PLPp (40mg/kg) demonstrou não provocar alterações significativas nas massas corporais dos órgãos, quando comparados

ao grupo periodontite e ao grupo controle negativo.

Tabela 2. Peso úmido (g/100 g de animal) de órgãos (fígado e rim) de ratos submetidos a periodontite induzida e tratados com proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg).

Parâmetros	Grupos experimentais		
	Controle negativo	Periodontite	PLPp
Fígado	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,08	3,7 ± 0,1
Rim	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,01	0,6 ± 0,01

Dados vistos como média ± E.P.M. Média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas, $p > 0,05$.

5.7 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS (CTL)

Para contagem do número de leucócitos no sangue total dos animais, os resultados estão apresentados na figura 14. Em animais pertencentes ao grupo periodontite houve aumento significativo de leucócitos totais ($14,121 \pm 481,7 \text{ mm}^3$) no sangue dos animais, em contraste, o grupo controle negativo demonstrou valores reduzidos para este parâmetro ($10,544 \pm 254,5 \text{ mm}^3$). Por sua vez quando os animais foram tratados com a fração proteica PLPp (40mg/kg), via *i. p.*, houve redução significativa na contagem de leucócitos ($12,283 \pm 156,3 \text{ mm}^3$).

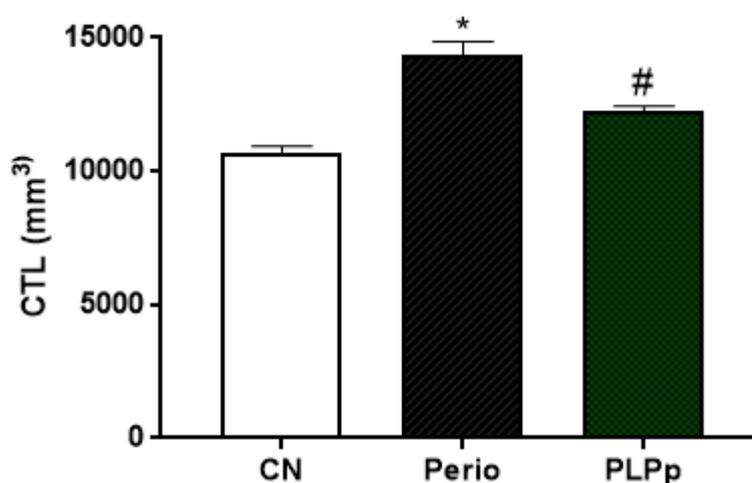


Figura 14. Efeitos de PLPp na Contagem Total de Leucócitos (CTL). * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média ± E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.8 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Para dosagem dos níveis de GSH no tecido hepático, animais com periodontite induzida apresentaram redução nos níveis da molécula ($0,187 \pm 0,01$ nmol/g de tecido), quando comparados ao grupo controle negativo ($0,466 \pm 0,03$ nmol/g de tecido). O tratamento dos animais com PLPp (40mg/kg), demonstrou preservar os níveis de GSH ($0,304 \pm 0,04$ nmol/g de tecido) (Figura 15A). Em contraste, para resultados da dosagem, avaliados no tecido renal não foram vistas diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 15B).

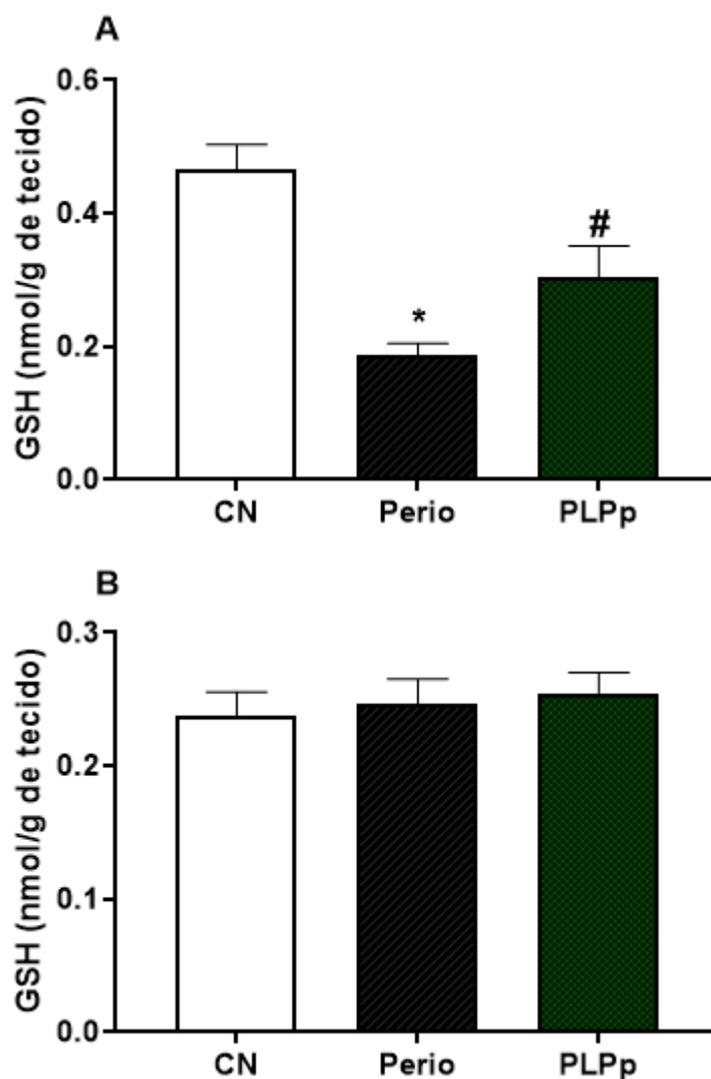


Figura 15. Efeitos de PLPp sobre os níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) no tecido hepático (A) e renal (B). *p < 0,05 vs grupo salina. #p < 0,05 vs grupo periodontite. Dados vistos como média ± E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.9 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO MALONDIALDEÍDO (MDA)

Dosagens da concentração de MDA no tecido hepático de animais pertencentes ao grupo periodontite apresentaram significativa elevação ($133 \pm 5,5$ nmol/g de tecido), diferentemente foram valores vistos para o grupo controle negativo ($81,52 \pm 1,0$ nmol/g de tecido), o tratamento dos animais durante 20 dias com a fração proteica (PLPp 40mg/kg), reduziu os resultados referentes a concentração da molécula ($88,04 \pm 0,7$ nmol/g de tecido). Em relação as concentrações da molécula em tecido renal dos animais, demonstrou-se elevada em animais com periodontite, não tratados ($347,1 \pm 2,5$), diferentemente do grupo controle ($141,9 \pm 2,3$), por sua vez animais tratados com PLPp (40 mg/kg) apresentaram leve redução ($308,6 \pm 2,6$), ainda assim estatisticamente significante, $p < 0,05$.

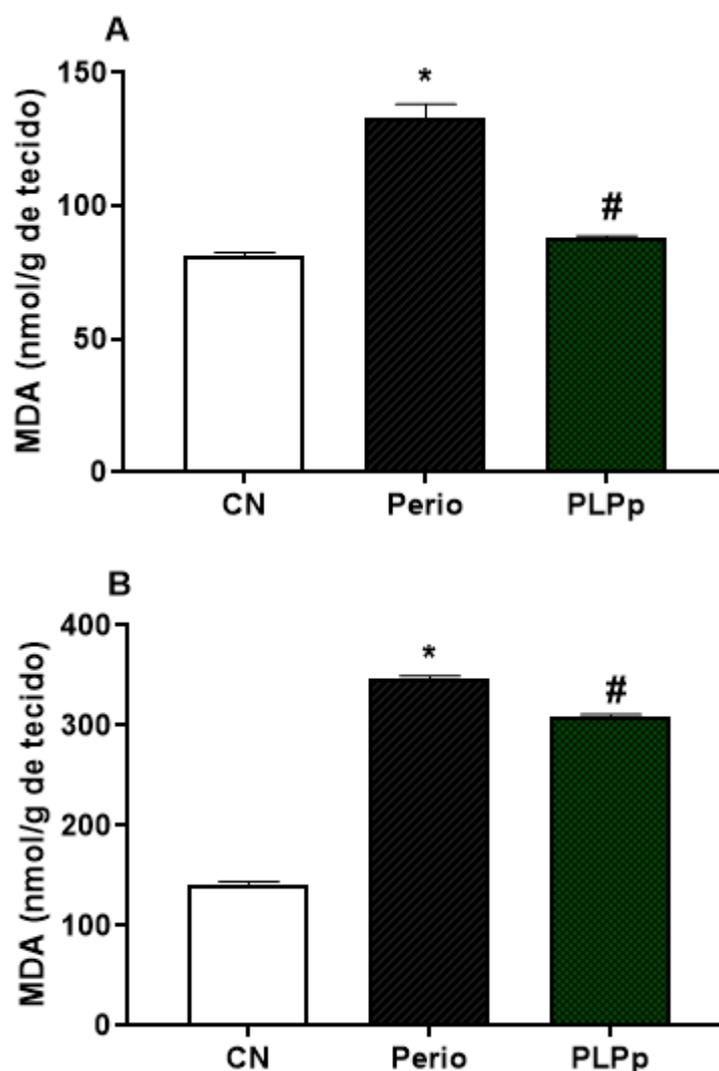


Figura 16. Efeitos de PLPp sobre a concentração de ácido malondialdeído (MDA) no fígado (A) e rim (B). * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.10 MENSURAÇÃO DE AMINOTRANSFERASES (AST E ALT)

Valores de aminotransferases séricas estão representados na figura 17. A periodontite elevou as concentrações de ALT no soro dos animais ($63,2 \pm 3,1$ U/L), quando comparado aos observados no grupo controle negativo ($49,8 \pm 1,7$ U/L). Em animais tratados com PLPp (40mg/kg), foi observada redução estatisticamente significativa, $p < 0,05$, para os dados obtidos ($49,3 \pm 5,6$ U/L) quando comparados ao grupo periodontite, assemelhando-se ao grupo controle negativo (Figura 17A), contudo, valores de AST diferiram entre grupos, entretanto, não foram consideradas significativas, $p > 0,05$, (Figura 17B).

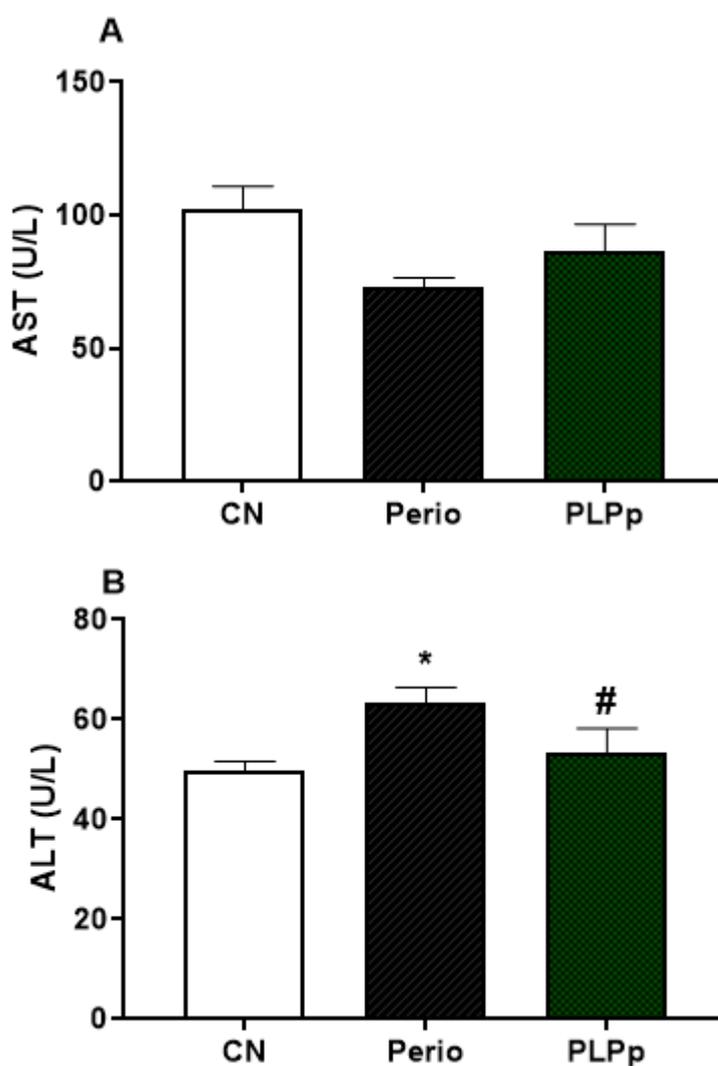


Figura 17. Mensuração de aminotransferases AST (A) e ALT (B). * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.11 VERIFICAÇÃO DE UREIA E CREATININA SÉRICA

Para resultados de marcadores renais séricos (ureia e creatinina), os dados estão representados na figura 18. Valores referentes a dosagem de ureia do grupo experimental PLPp 40mg/kg não demonstraram significância quando comparados ao grupo periodontite, $p > 0,05$. Resultados para creatinina apresentaram-se baixos no grupo periodontite ($0,25 \pm 0,05$ mg/dL), o grupo controle negativo apresentou valores elevados ($0,36 \pm 0,02$), de modo semelhante foi visto para resultados do grupo tratado com PLPp (40mg/kg) ($0,48 \pm 0,05$ mg/dL).

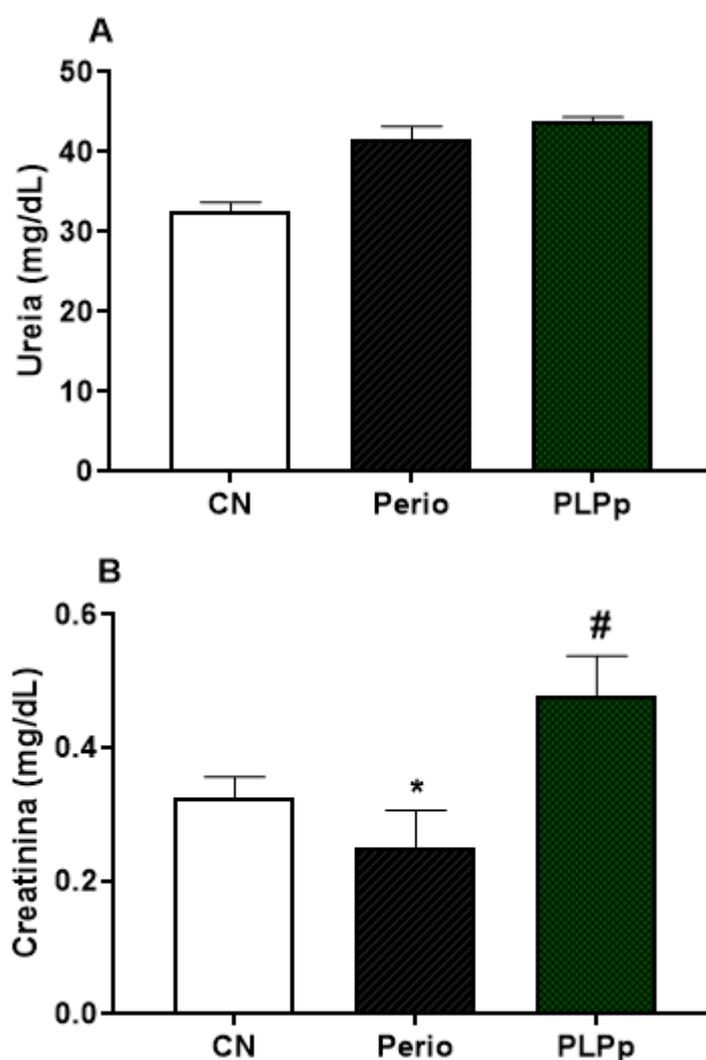


Figura 18. Dosagem de ureia (A) e creatinina (B) no soro sanguíneo. * $p < 0,05$ vs grupo salina. # $p < 0,05$ vs grupo periodontite. Dados vistos como média \pm E.P.M. média de 8 animais por grupo. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas. CN – Controle Negativo; Perio – Periodontite; PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica* (40mg/kg; *i. p.*).

5.12 BIOMARCADORES SANGUÍNEOS

Além dos marcadores bioquímicos já descritos, outros foram avaliados no soro sanguíneo dos grupos de animais, como apresentados na tabela 3. Para resultados de marcadores analisados no soro sanguíneo de animais tratados com a fração PLPp (40mg/kg), albumina e cálcio quando dosados, demonstraram resultados significantes quando comparados aos animais sem qualquer tipo de tratamento, apenas com a indução periodontal.

Tabela 3. Avaliações de biomarcadores sanguíneos.

	Controle negativo	Periodontite	PLPp
Ácido Úrico	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Albumina	3,3 ± 0,09	2,6 ± 0,1*	3,2 ± 0,08 [#]
Cálcio Total	10,4 ± 0,1	9,03 ± 0,2*	10,8 ± 0,2 [#]
Colesterol Total	98,1 ± 4,8	93,3 ± 6,3	90,4 ± 5,5
Colesterol HDL	25,3 ± 0,4	26,6 ± 1,0	26,1 ± 0,8
Fosfatase Alcalina	61,2 ± 4,4	63,6 ± 6,0	65,5 ± 5,1
Proteínas Totais	7,7 ± 0,1	9,1 ± 0,5	8,9 ± 0,3

Dados vistos como média ± E.P.M. Média de 8 animais por grupo. *p< 0,05 vs grupo salina. #p< 0,05 vs grupo periodontite. ANOVA one-way seguido por teste de Turkey's para comparações múltiplas.

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que associa os efeitos farmacológicos de proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp) com os efeitos clínicos da periodontite. Em animais tratados com PLPp (40mg/kg), foram observadas reduções em parâmetros inflamatórios, na progressão da perda de altura óssea alveolar, na contagem de leucócitos, além da redução de biomarcadores de lesão tecidual e preservação da estrutura morfológica de tecidos estudados.

A periodontite é responsável por inúmeras respostas inflamatórias teciduais visíveis, desde a presença de úlceras, edemas, hemorragias, alterações de cor no tecido afetado e sangramento local (PAVONE *et al.*, 2015). O modelo experimental utilizando animais murinos (ratos), tem sido interessantemente utilizado com intuito testar hipóteses biológicas e fisiológicas, além de ser utilizado por obter vantagens como fornecer resultados rápidos e satisfatórios para instalação e progressão da periodontite crônica, além de observar-se semelhança anatômica de seus tecidos periodontais ao dos humanos (HATIPOGLU *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2016; DE MOLON *et al.*, 2018).

Nos últimos anos é notável o crescimento de estudos que reportam o potencial científico/farmacológico de várias espécies de plantas, onde se relacionam atividades antioxidantes, antimicrobianas, analgésicas, antitumorais e até mesmo anti-inflamatórias, instigando a investigação para possíveis descobertas de novas fontes bioativas com propriedades benéficas (FERNANDES *et al.*, 2015; KERCHE SILVA, 2017; LOURENÇO *et al.*, 2018; NASRI *et al.*, 2018 RIBEIRO *et al.*, 2018).

Por apresentar propriedades farmacológicas já comprovadas como, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (FERNANDES *et al.*, 2015), antidiarreica (SANTANA *et al.*, 2016), e por apresentar baixa toxicidade em modelos animais (SOUZA, 2018), frações do látex de *P. pudica* 40mg/kg, foram utilizadas frente a periodontite experimental induzida em modelos animais. O presente estudo contribui para demonstrar e reforçar atividades farmacológicas já vistas em proteínas encontradas no látex desta planta. O que seria de interessante percepção, encontrarmos alternativas terapêuticas, seguras, de fácil obtenção, disponibilidade e baixo custo, uma vez que a periodontite é um agravo considerado de saúde pública.

A instalação de um biofilme bacteriano a nível de sulco gengival é responsável por iniciar e dar progressão ao processo inflamatório no tecido afetado, levando consequentemente ao aumento da profundidade de bolsa periodontal (DONOS, 2017).

Animais tratados com a fração PLPp (40mg/kg), apresentaram reduções em

parâmetros inflamatórios, com diminuição de edema localizado, pouca presença focos ulcerativos e diminuição de sangramento a nível gengival, parâmetros estes analisados de acordo com escores designados por Liu *et al.*, (2012), quando comparados aos animais do grupo periodontite, que obtiveram os mesmos escores de forma elevada para parâmetros inflamatórios.

Valores referente ao Índice de profundidade de sondagem apresentaram-se reduzidos em animais submetidos ao tratamento com PLPp (40 mg/kg), demonstrando melhorias para as consequências clínicas da doença, uma vez que índices elevados de IPS e ISG, indicam de forma evidente de progressão da periodontite (CARVALHO *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2018).

A enzima mieloperoxidase liberada por grânulos azurófilos de neutrófilos polimorfonucleares, é utilizada como marcador de atividade inflamatória, de modo indireto para medir a infiltração neutrofílica tecidual, encontrando-se nestes casos em níveis elevados (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2009). Neutrófilos são considerados células de linha de frente durante um processo inflamatório, com a progressão da periodontite, a mieloperoxidase é intensamente liberada por polimorfonucleares na tentativa de fagocitar microrganismos invasores (GUIMARÃES *et al.*, 2016; YOSHIHARA-HIRATA *et al.*, 2018).

PLPp (40mg/kg) foi capaz de reduzir o infiltrado neutrofílico em aproximadamente 68,2% na porção gengival dos animais (Figura 11), resultados semelhantes foram vistos em estudo utilizando extratos da planta *Tocoyena sellowiana* (Jenipapo bravo), no modelo de periodontite induzida em ratos (RIBEIRO *et al.*, 2018); e também quando foram utilizados extratos aquosos de flores de *Calendula officinales* (Margarida) em ratos submetidos a periodontite induzida (SOUSA *et al.*, 2018). A capacidade em reduzir a atividade de MPO foi anteriormente observada por nosso grupo de pesquisa no trabalho publicado por Fernandes *et al.*, (2015). PLPp reduziu de modo significativo a atividade intraplantar de MPO induzida pela administração de carragenina em animais.

O microrganismo *Porphyromonas gengivalis* um dos principais envolvidos diretamente com a periodontite, tem capacidade de secretar moléculas que agem por inibir maturação e mineralização de osteoclastos, reduzindo altura óssea alveolar e reabsorção óssea (ZHANG *et al.*, 2014). Na periodontite experimental, a ligadura fixada aos dentes dos animais leva ao aumento significante da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (PRESTES *et al.*, 2018). A perda óssea alveolar é um dos eventos mais característicos e específicos da periodontite, sabe-se que citocinas liberadas durante a resposta inflamatória são responsáveis por danos lesivos causados ao tecido (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Para análise da altura óssea alveolar (AOA), foi observado diferença estatística significativa, $p < 0,05$, quando realizado comparações entre os grupos PLPp e grupo periodontite, onde PLPp na dose de 40mg/kg conseguiu reduzir significativamente a perda óssea alveolar (Figura 13), de modo semelhante, aos resultados apresentados pelo grupo controle negativo. Resultados como estes assemelham-se aos obtidos por administração de extratos de *Crateagus orientalis* para prevenção da perda óssea alveolar na periodontite experimental induzida em ratos (HATIPOGLU *et al.*, 2015); por Ribeiro *et al.*, (2018), onde extratos de *Tocoyena sellowiana* (Jenipapo bravo), inibiram de forma significativa a perda óssea alveolar, quando os animais eram tratados com doses do extrato da planta.

PLPp (40mg/kg) não demonstrou alterações significantes em relação ao peso do órgão/massa corporal dos animais, de igual modo nenhum grupo apresentou diferença estatística para este parâmetro. Tomofuji *et al.*, (2007), relatam em estudo não haver diferença entre peso de animais saudáveis e animais com periodontite induzida. Carvalho *et al.*, (2017), notaram que a indução da periodontite não causou alterações significantes no peso do fígado de animais, quando comparados com o grupo controle negativo. De mesmo modo, Vasconcelos *et al.*, (2018) não descrevem diferença significativa para peso corporal e peso do fígado entre animais saudáveis e com periodontite.

Processos inflamatórios são característicos pelo recrutamento de células leucocitárias, onde os neutrófilos exibem papel principal, como células que migram para os tecidos agredidos, apresentando-se para resposta primária do sistema imunológico (ROSSAINT; MARGRAF; ZARBOCK, 2018).

PLPp (40 mg/kg) conseguiu reduzir de maneira significativa a contagem de células leucocitárias no sangue total dos animais tratados, demonstrando ação anti-inflamatória por parte do produto proteico, como já mencionado em estudo anterior (FERNANDES *et al.*, 2015). Em estudo similar, utilizando produtos naturais, o extrato de *Matricaria recutita* L. (camomila), obteve êxito em reduzir o número de leucócitos sanguíneo, principalmente na série neutrofílica e também baixa em outras linhagens como linfócitos (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Leite *et al.*, (2014) em estudo, demonstram que em pacientes que sofriam com periodontite severa, submetidos a terapia periodontal (pós-tratados), os valores relacionados a contagem de células brancas estavam reduzidos quando comparados a pacientes antes do tratamento.

Em pacientes saudáveis existe uma relação de equilíbrio entre o sistema antioxidante e as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas no organismo (HATIPOGLU *et al.*, 2015). Pacientes que sofrem com quadros de periodontite crônica desenvolvem baixa

capacidade de funcionamento do sistema antioxidante quando comparados a pacientes saudáveis, com isso a produção excessiva de EROs por neutrófilos sensibilizados, são uma das condições patológicas mais específicas relacionadas com a periodontite, em muitos casos acarretando dano lesivos aos tecidos agredidos (HATIPOGLU *et al.*, 2015; TÓTHOVÁ; CELEC, 2017; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017).

Estudos demonstram que neutrófilos isolados do sangue periférico de pacientes portadores de periodontite, geram níveis mais altos de EROs quando comparados a neutrófilos isolados do sangue periféricos de pacientes saudáveis (WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017).

O procedimento de periodontite experimental resulta em baixa significante dos níveis de GSH, com subsequente aumento da concentração de MDA nos tecidos lesados, de igual modo visto na periodontite crônicas em humanos (AMBATI *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017)

Níveis de GSH avaliados no tecido hepático de animais tratados com a fração proteica (PLPp 40 mg/kg), encontraram-se preservados próximos a normalidade. Como observado e descrito por França *et al.*, (2017), animais submetidos ao procedimento de periodontite experimental por ligadura, sem qualquer tipo de tratamento, tendem a apresentar níveis de GSH inferiores a normalidade, demonstrando haver consumo desta molécula pelo sistema de defesa antioxidante.

O Ácido malondialdeído (MDA) é um subproduto da peroxidação lipídica, liberado durante o processo de estresse oxidativo, é biomarcador comumente encontrado em paciente com periodontite crônica, seus altos índices são encontrados principalmente no plasma, em eritrócitos e tecidos, se relacionam com a doença, indicando um aumento da quantidade de metabólitos da peroxidação lipídica, gerando agressões ao DNA celular e proteínas (HAN; SUN; YANG, 2016; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017; AHMADI-MOTAMAYEL *et al.*, 2018)).

A fração proteica conseguiu reduzir concentrações de MDA de modo significativo, preservando o bom funcionamento do sistema antioxidante (Figura 15), diferentemente do grupo periodontite onde a concentração dessa molécula se elevou, de igual modo visto em estudo realizado por Wei *et al.*, (2010), que demonstrou a presença de altos níveis de MDA no soro sanguíneo de pacientes com periodontite crônica, com subsequente diminuição logo após o tratamento, esse decréscimo na concentrações da molécula após tratamento, também foi observado por Ambati *et al.*, (2017). Os dados de preservação dos níveis de GSH e MDA corroboram com os achados de Santana *et al.*, (2018). Animais submetidos à diarreia induzida por óleo de rícino e tratados com PLPp (40mg/kg) apresentaram níveis de GSH e MDA

semelhantes ao de animais controle sem indução da diarreia.

Níveis elevados de aminotransferases estão diretamente envolvidos com desordens teciduais e possivelmente danos celulares, valores elevados de AST indicam lesões musculares e hepáticas, enquanto níveis elevados de ALT indicam agravos hepáticos (KUDVA *et al.*, 2014; GAL, 2015). ALT tem sido relatado ser mais específico para danos causados ao fígado do que AST, uma vez que AST também é difusamente localizado quantitativamente em outros tecidos (MOTTA, 2011).

Para níveis de aminotransferases, PLPp (40mg/kg), conseguiu reduzir de maneira significativa os níveis de ALT no soro sanguíneo dos animais, o mesmo não foi visto para níveis de AST quando comparados ao grupo Periodontite, não promovendo alterações neste tipo de transaminase onde pode ser visto elevação em seus valores. Widita *et al.*, (2018) relatam em estudo elevação significativa para níveis de ALT no tecido hepático de japoneses adultos, enquanto os níveis de AST não foram associados com Doença Periodontal. Para resultados de estudos experimentais utilizando produtos naturais como possíveis agentes de tratamento, nossos dados corroboram com dados apresentados por Teixeira *et al.*, (2017), no qual utilizando extratos da planta *Stemodia maritima L.* Também não foram creditadas alterações em moléculas desta família.

Já foi elucidado que os danos gerados pela periodontite crônica podem afetar o endotélio renal, caracterizando a doença com sistêmica (BROTTO *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2018). Almeida *et al.*, (2018) reforçam que o controle por meio do tratamento para progressão da doença periodontal (periodontite) pode implicar diretamente na manutenção de um bom funcionamento do sistema renal. A avaliação de ureia e creatinina renal fazem parte do controle e averiguação do funcionamento da homeostase renal (MOTTA, 2011).

Foi observado que em animais tratados com PLPp (40mg/kg), os níveis de creatinina permaneceram de acordo com a normalidade, quando comparados aos valores encontrados no soro sanguíneo de animais saudáveis, diferentemente dos animais que sofreram indução periodontal, onde foi observado uma diminuição nestes valores. Para valores correspondentes a dosagem de ureia soros não houve diferença significativa entre os grupos.

Achados semelhantes podem ser observados em informações trazidas por Craig *et al.*, (2012), onde descrevem em seus achados, estudo realizado com 253 paciente taiwaneses relatou associação entre a periodontite moderada e a diminuição de, creatinina e ureia no soro sanguíneo destes pacientes. Entretanto em achados vistos por Brotto *et al.*, (2011), resultados para ureia e creatinina no soro sanguíneo de pacientes saudáveis não diferiram entre paciente com periodontite, do mesmo modo que visto por França *et al.*, (2017). Como pode ser visto,

níveis de creatinina e ureia no soro sanguíneo tendem a variar em pacientes afetados pela periodontite, investigações adicionais devem ser realizadas para melhor elucidação da relação entre a periodontite e os níveis sanguíneos de marcadores renais.

Outros biomarcadores sanguíneos também foram dosados, para seus resultados PLPp (40mg/kg) apresentou diferença significativa, em valores referentes a albumina e cálcio total quando comparados ao grupo periodontite. A periodontite é capaz de reduzir níveis séricos de albumina em pacientes portadores de doenças renais, proteína esta, envolvida diretamente em processos inflamatórios (CRAIG *et al.*, 2012; TAYLOR, 2014). Acredita-se que a perda de massa óssea que é um dos eventos mais característicos da periodontite esteja ligada diretamente com a depleção de cálcio e vitamina D no organismo (GARCIA *et al.*, 2011). Para outras moléculas não foram vistas diferenças significantes entre grupos, mesmo com leve diminuição nos valores ou aumentos.

Por ser descrita como um fator de risco para doenças sistêmicas, seus agravos podem apresentar respostas em diferentes tecidos (RATHOD *et al.*, 2018). Microrganismos e seus produtos metabólicos gerados podem ser responsáveis pela patogenicidade relacionada doenças às doenças sistêmicas (TOMOFUJI *et al.*, 2007; PATHAK; MAHANTA, 2018).

Santana *et al.*, (2018), através de ensaios colorimétricos observaram em PLPp a presença de proteínas como, cisteino-proteases, inibidores de proteases e quitinase, moléculas estas conhecidas por apresentarem atividade anti-inflamatória (HIEMSTRA, 2002; RATHNAVELU *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2017). Durante ensaio experimental realizado por nosso grupo de pesquisa, PLPp foi tratada com iodoacetamida (PLPp IAA), um inibidor de cisteino-proteases e desnaturada por aquecimento (PLPp 100°). O tratamento térmico aboliu as atividades anti-inflamatória e antidiarreica, evidenciando a natureza proteica da atividade investigada (FERNANDES *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2018). Por outro lado, inibidores de proteases vegetais são moléculas descritas como termoestáveis continuaram presente em PLPp 100° (SANTANA *et al.*, 2018), sugerindo que estas não estariam envolvidas nas atividades investigadas. PLPp IAA continuou apresentando atividade antidiarreica e anti-inflamatória, sendo assim possível descartar a hipótese do envolvimento da atividade de protease cisteínicas nas atividades biológicas.

Recentemente, quitinases encontradas no látex de *Calotropis procera* foram demonstradas estar envolvidas com o efeito anti-inflamatório encontrado em uma fração proteica deste látex (VIANA *et al.*, 2017). Levanta-se a hipótese de que quitinases presentes em PLPp poderiam estar associadas com a atividade anti-inflamatória que PLPp apresentou frente as condições clínicas atribuídas pela periodontite. Contudo, estudos mais aprofundados

envolvendo etapas de purificação de proteínas estão em progresso em nosso laboratório com o objetivando avançar na determinação de quais moléculas estariam envolvidas e do real mecanismo associado ao efeito estudado.

A partir dos resultados obtidos, esperamos contribuir para novas descobertas do uso de plantas laticíferas com potencial atividade farmacológicas, instigando que a descoberta e utilização de outros produtos naturais com finalidades benéficas sejam avaliadas futuramente, bem como avaliar alterações sistêmicas decorrentes do tratamento com PLPp em ratos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento de animais submetidos a periodontite experimental com proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp), foi capaz de reduzir a atividade anti-inflamatória no tecido gengival dos animais, efeitos provocados pelo acúmulo de microrganismo nos tecidos periodontais, melhorando parâmetros clínicos e inflamatórios. O tratamento com PLPp demonstrou prevenir a perda óssea alveolar visto por meio de análises morfométricas. Animais tratados com a fração apresentaram reduções em contagens totais de leucócitos no sangue total.

Em relação a marcadores de estresse oxidativo, PLPp conseguiu preservar níveis e concentrações próximas a normalidade de moléculas intracelulares que compõem o sistema antioxidante (GSH e MDA) no tecido hepático, mantendo uma boa funcionalidade do organismo. Além também de reduzir o infiltrado inflamatório neutrofílico no tecido gengival (MPO). Para resultados das análises bioquímicas, a fração conseguiu reduzir níveis e concentrações de marcadores de agravos hepáticos (ALT) e renais (creatinina) quando comparados ao grupo periodontite, moléculas estas liberadas em alta concentração no soro sanguíneo dos animais principalmente em processos patológicos.

Como visto, o produto natural PLPp é um material promissor com moléculas que apresentam atividades interessantes. Novas investigações para identificar individualmente moléculas presentes neste produto com atividade biológica serão seguidas.

8. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHALWAYA, S.; VAN VUUREN, S.; PATEL, M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 359-371, 2018.

ALEXANDRE, J. T. M.; SOUSA, L. H. T.; LISBOA, M. R. P.; FURLANETO, F. A. C.; VAL, D. R.; MARQUES, M.; VASCONCELOS, H. C.; MELO, I. M.; LEITÃO, R.; BRITO, G. A. C.; GOES, P. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. *Clinical oral investigations*, v. 22, n. 6, p. 2175-2185, 2018.

ALMEIDA, R. M.; BRAGA, N. M. A.; SOUZA, G. C. L. L.; SOARES, C. M. D.; ALVES, M. A.; MACEDO, V. C. M. Uso de antimicrobianos sistêmicos e locais no tratamento da Periodontite Agressiva. **Oral Sciences**, p. 4-9, 2017.

AMBATI, M.; RANI, K. R.; REDDY, P. V.; SURYAPRASANNA, J.; DASARI, R.; GIREDDY, H. Evaluation of oxidative stress in chronic periodontitis patients following systemic antioxidant supplementation: a clinical and biochemical study. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 8, n. 1, p. 99, 2017.

ARRUDA, A. S.; FARIA, R. Q.; PEIXOTO, N.; MOREIRA, A. S. F. P.; FLORIANO, J. F.; GRAEFF, C. F. O.; GONÇALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M. Mangabeira latex production evaluation in cerrado region of goiás. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 3, p. 939-948, 2016.

ARZATE, H.; ZEICHNER-DAVID, M.; MERCADO-CELIS, G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 211-233, 2015.

BAUER, G.; FRIEDRICH, C.; GILLIG, C.; VOLLRATH, F.; SPECK, T.; HOLLAND, C. Investigating the rheological properties of native plant látex. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1–6, 2013.

BECK, J. D.; MOSS, K.; MORELLI, T.; OFFENBACHER, S. Periodontal profile class is associated with prevalent diabetes, coronary heart disease, stroke, and systemic markers of C-reactive protein and Interleukin-6. **Journal of periodontology**, 2018.

BINDHU, O. S.; SINGH, M. K. Hemostatic, milk clotting and blood stain removal potential of cysteine proteases from *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, p. 350–356, 2014.

BORGES, M. F. **Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas com aditivos funcionais para tratamentos regenerativos periodontais**, Uberlândia, 2018, 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia.

BOSCO, A. F.; BONFANTE, S.; ALMEIDA, J. M.; LUIZE, D. M.; NAGATA, M. J. H.; GARCIA, V. G. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 3, p. 527-532, 2007.

BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. Periodontal Pathogenesis: Definitions and Historical Perspectives. In: **Pathogenesis of Periodontal Diseases**. Springer, Cham, 2018. p. 1-7.

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

BROTTO, R. S.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L.; MARCANTONIO, R. A. C.; RAMOS, A. P. P.; PEPATO, M. T. Lack of correlation between periodontitis and renal dysfunction in systemically healthy patients. **European journal of dentistry**, v. 5, n. 1, p. 8, 2011.

BUNTE, K.; HENSEL, A.; BEIKLER, T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. **Fitoterapia**, 2018.

CARVALHO, J. S.; VASCONCELOS, A. C. C. G.; ALVES, E. H. P.; CARVALHO, A. S.; DA SILVA, F. R. P.; NETO, A. P. R. N.; DI LENARDO, D.; DE SOUZA, L. K. M.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J-V. R.; DE OLIVERIA, J. S.; VASCONCELOS, D. F. P. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of periodontal research**, v. 52, n. 5, p. 883-892, 2017.

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. Cooperativa Editora e de Cultura Médica, 1975.

CASTELBLANQUE, L.; BALAGUER, B.; MARTI, C.; RODRIGUEZ, J. J.; OROZCO, M.; VERA, P. Multiple facets of laticifer cells. **Plant signaling & behavior**, v. 12, n. 7, p. e1300743, 2017.

CHATTOPADHYAY, A.; DIXIT, B.; NIJHAWAN, P.; KAMARUDHEEN, N.; RAO, B. Phytochemical screening, in vitro anti quorum sensing activity and antioxidant activity of extracts of Plumeria alba, Pisonia alba and Cynodon dactylon. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n 02, p. 162-166, 2017.

CHAVES, C. O.; ALVES, C. M. C.; LIMA, L. L.; PEREIRA, A. F.V. Autopercepção e condição periodontal de pacientes com periodontite agressiva/self-perception and periodontal condition of patients with aggressive periodontitis. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 18, n. 2, 2018.

CHOLIQ, F. A.; CHEN, T-H.; SULISTYOWATI, L. Molecular Characterization of a Rigid Rod-Shaped Virus Isolated from Frangipani (Plumeria sp.) Showing Mosaic Symptom in Taiwan. **The Journal of Experimental Life Science**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2017.

CHRYSANTHAKOPOULOS, N. A. Correlation between periodontal disease indices and lung cancer in Greek adults: a case—control study. **Experimental oncology**, n. 38, n. 1, p. 49-53, 2016.

COSTA, N. D. D. J.; OLIVEIRA, S. F. D. C.; SILVA, J. D. N.; PACHECO, A. C. L.; ABREU, M. C. D.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FERREIRA, P. M. P. Potencial terapêutico e tecnológico da planta Calotropis procera. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 3, p. 2222-2236, 2015.

CRAIG, R. G.; PERNAT, A. M.; PECOITS-FILHO, R.; LEVIN, N. W.; KOTANKO, P. Periodontal diseases and systemic inflammation. In: **Seminars in dialysis**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2013. p. 23-28.

CROSSMAN, J.; ELYASI, M.; EL-BIALY, T.; MIR, C. F. Cementum Regeneration Using Stem Cells in the Dog Model: A Systematic Review. **Archives of Oral Biology**, 2018.

DA SILVA, F. R. P.; VASCONCELOS, A. C. C. G.; ALVES, E. H. P.; JUNIOR, P. V. O.; DE OLIVEIRA, J. S.; VASCONCELOS, D. F. P. Bromelain: A potential strategy for the adjuvant treatment of periodontitis. **Dental Hypotheses**, v. 7, n. 3, p. 88, 2016.

DA SILVA, J. C.; MUNIZ, F. W. M. G.; OBALLE, H. J. R.; ANDRADES, M.; ROSING, C. K.; CAVAGNI, J. The effect of periodontal therapy on oxidative stress biomarkers: A systematic review. **Journal of clinical periodontology**, 2018.

DARVEAU, P. R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature review microbiology**, v. 8, p. 481-488, 2010.

D'AVILA, S.; REIS, L. D.; PIATTELLI, A.; AGUAIAR, K.C.S.; FAVERI, M.; BORGES, F. L. Impact of smoking on human bone apposition at different dental implant surfaces: a histologic study in type IV bone. **Journal of Oral Implantology**, v. 36, n. 2, p. 85-90, 2010.

DE ARVELO, E. R.; RAMIS, C.; ALONSO, F. T. Ribonuclease Activity in Latex from *Calotropis procera* (Aiton) WT Aiton and *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, v. 66, n. 2, p. 7057-7070, 2013.

DE CARVALHO, C.; LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; HIRATA, L. M. Ferrugem em *Plumeria* spp. (Apocynaceae) em Mato Grosso do Sul.

DESCHAMPS-LENHARDT, S.; MARTIN-CABEZAS, R.; HANNEDOUCHE, T.; HUCK, O. Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. **Oral diseases**, v. 25, n. 2, p. 385-402, 2019.

DE MOLON, R. S.; PARK, C. H.; JIN, Q.; SUGAI, J.; CIRELLI, J. A. Characterization of ligature induced experimental periodontitis. **Microscopy Research and Technique**, 2018.

DE OLIVEIRA, J. S.; PINTO, M. S. C.; SANTANA, L. A. B.; PINTO, A. S. B.; DI LENARDO, D.; VASCONCELOS, D. F. P. Biological Effects of Medicinal Plants on Induced Periodontitis: A Systematic Review. **International journal of dentistry**, v. 2016, 2016.

DHINGRA, K. Aloe vera herbal dentifrices for plaque and gingivitis control: a systematic review. **Oral diseases**, v. 20, n. 3, p. 254-267, 2014.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta medica**, v. 74, n. 07, p. 699-711, 2008.

DRAKE, P. M. W.; SZETO, T. H.; PAUL, M. J.; TEH, A. Y-H.; MA, J. K-C. Recombinant biologic products versus nutraceuticals from plants—a regulatory choice?. *British journal of clinical pharmacology*, v. 83, n. 1, p. 82-87, 2017.

EKE, P. I.; THORNTON-EVANS, G. O.; WEI, L.; BORGNACKE, W. S.; DYE, B. A.; GENCO, R. J. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. **The Journal of the American Dental Association**, v. 149, n. 7, p. 576-588. e6, 2018.

EMIRU, Y. K.; SIRAJ, E. A.; TEKLEHAIMANOT, T. T.; AMARE, G. G. Antibacterial Potential of Aloe weloensis (Aloeacea) Leaf Latex against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Strains. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

FANG, F.; WU, B.; QU, Q.; GAO, J.; YAN, W.; HUANG, X.; MA, D.; YUE, J.; CHEN, T.; LIU, F.; LIU, Y. The clinical response and systemic effects of non-surgical periodontal therapy in end-stage renal disease patients: a 6-month randomized controlled clinical trial. **Journal of clinical periodontology**, v. 42, n. 6, p. 537-546, 2015.

FERNANDES, H. B.; MACHADO, D. L.; DIAS, J. M.; BRITO, T. V.; BATISTA, J. A.; SILVA, R. O.; PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; RAMOS, M. V.; MEDEIROS, J-V. R.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; BARBOSA, A. L. R.; OLIVEIRA, J. S. Laticifer proteins from Plumeria pudica inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 269-277, 2015.

FILHO, M. D. S.; MEDEIROS, J-V. R.; VASCONCELOS, D. F. P.; SILVA, A. D.; LEÓDIDO, A. C. M.; FERNANDES, H. F.; SILVA, F. R. P.; FRANÇA, L. F. C.; DI LENARDO, D.; PINTO **macromolecules**, v. 107, p. 1093-1101, 2018, G. R. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International journal of biological**

FRANÇA, L. F. C.; VASCONCELOS, A. C. G.; DA SILVA, F. R. P.; ALVES, E. H. P.; CARVALHO, J. S.; DI LENARDO, D.; DE SOUZA L. K. M.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J-V. R.; DE OLIVEIRA, J. S. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. **Journal of clinical periodontology**, 2017.

FREIRES, I. A.; SANTAELLA, G. M.; SARDI, J. C. O.; ROSALEN, P. L. The alveolar bone protective effects of natural products: a systematic review. **Archives of oral biology**, 2017.

GAMA, T. S. S.; RUBIANO, V. S.; DEMARCO, D. Laticifer development and its growth mode in Allamanda blanchetii A. DC. (Apocynaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 144, n. 3, p. 303-312, 2017.

GARCIA, M. N.; HILDEBOLT, C. F.; MILEY, D. D.; DIXON, D. A.; COUTURE, R. A.; SPEARIE, C. L. A.; LANGENWALTER, E. M.; SHANNON, W. D.; DEYCH, E.; MUELLER, C.; CIVITELLY, R. One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 82, n. 1, p. 25-32, 2011.

GAW, A.; MURPHY, M. J.; SRIVASTAVA, R.; COWAN, R. A.; OREILLY, D. S. **J. Bioquímica clínica**. Elsevier Brasil, 2015.

GOMES, D. A.S.; PIRES, J. R.; ZUZA, E. P.; MUSCARA, M. N.; HERRERA, B. S.; SPOLIDORIO, L. C.; TOLEDO, B. E. C.; SPOLIDORIO, D. M. P. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. **Immunological investigations**, v. 38, n. 2, p. 117-122, 2009.

GUPTA, P.; SHETTY, H. Use of natural products for oral hygiene maintenance: revisiting traditional medicine. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 2018.

HAN, P.; SUN, D.; YANG, J. Interaction between periodontitis and liver diseases. **Biomedical reports**, v. 5, n. 3, p. 267-276, 2016.

HATIPOĞLU, M.; SAGLAM, M.; KOSEOĞLU, S.; KOKSAL, E.; KELES, A.; ESEN, H. H. The effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber. (Hawthorn) extract administration in preventing alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128134, 2015.

HE, S.; THOMSON, W. M. An oral epidemiological comparison of Chinese and New Zealand adults in 2 key age groups. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 46, n. 2, p. 154-160, 2018.

HEIKKILÄ, P.; BUT A.; SORSA, T.; HAUKKA, J. Periodontitis and Cancer Mortality: Register-based Cohort Study of 68 273 Adults in 10 year follow up. **International journal of cancer**, 2018.

HELENIUS-HIETALA, J.; SUOMINEM, A. L.; RUOKONEN, H.; KNUUTILILA, M.; PUUKKA, P.; JULA, A.; MEURMAN, J. H.; ABERG, F. Periodontitis is associated with incident chronic liver disease—A population-based cohort study. **Liver International**, v. 39, n. 3, p. 583-591, 2019.

HICKL, J.; ARGYROPOULOU, A.; SAKAVITSI, M. E.; HALABALAKI, M.; AL-AHMAD, A.; HELLWIG, E.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L.; WITTMER, A.; VACH, K.; KARYGIANNI, L. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0207574, 2018.

HIEMSTRA, P. S. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 2, p. 116-120, 2002.

HUA, J.; LIU, Y.; XIAO, C.-J.; JING, S.-X.; LUO, S.-H.; LI, S.-H. Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. **Phytochemistry**, v. 136, p. 56-64, 2017.

HUBER, M.; EPPING, J. GRONOVER, C. S.; FRICKE, J.; AZIZ, Z.; BRILLATZ, T.; SWYERS, M.; KOLLNER, T. G.; VOGEL, H.; HAMMERBACHER, A.; TRIEBWASSER-FREESE, D.; ROBERT, C. A. M.; VERHOEVEN, K.; PREITE, V.; GERSHENZON, J.; ERB, M. et al. A latex metabolite benefits plant fitness under root herbivore attack. **PLoS biology**, v. 14, n. 1, p. e1002332, 2016.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral. Texto, Atlas, Correlações Clínicas*. Editora Panamericana. SP. 2004; 2.

KERCHE SILVA, L. E. Avaliação in vitro e in vivo da capacidade antioxidante e antitumoral da fração C do látex de *Hevea brasiliensis* RRIM 600. 2017.

KITAJIMA, S.; AOKI, W.; SHIBATA, D.; NAKAJIMA, D.; SAKURAI, YAZAKI, K.; MUNAKATA, R.; TAIRA, T.; KOBAYASHI, M.; ABURAYA, S.; SAVADOGO, E. H.; HIBINO, S.; YANO, H. Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*). **Planta**, p. 1-16, 2018.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1510-1530, 2011.

KUMAR, V. L.; PANDEY, VERMA, S.; DAS, P. Protection afforded by methanol extract of *Calotropis procera* latex in experimental model of colitis is mediated through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1602-1609, 2019.

KURAJI, R.; ITO, H.; FUJITA, M.; ISHIGURO, H.; HASHIMOTO, S.; NUMABE, Y. Porphyromonas gingivalis induced periodontitis exacerbates progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. **Clinical and experimental dental research**, v. 2, n. 3, p. 216-225, 2016.

LALLIER, T. E.; MATURIN, E.; BRADY, M.; STOUTE, D.; WARD, T. Resistance to cigarette smoke is increased in periodontal ligament cells by attachment to collagen and fibronectin. **Journal of periodontology**, v. 86, n. 1, p. 91-100, 2015.

LAZAR, V.; SAVIUC, C-M.; CARMEN CHIFIRIUC, M. Periodontitis and Periodontal Disease-innovative strategies for reversing the chronic infectious and inflammatory condition by natural products. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 2, p. 230-237, 2016.

LEILEI, Z.; XIAOXUE, Y.; JIE S.; XINJUN, X. Identification of Three Kinds of Plumeria Flowers by DNA Barcoding and HPLC Specific Chromatogram. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2018.

LEITE, A. C. E.; CARNEIRO, V. M. A.; GUIMARÃES, M. C. M. Effects of periodontal therapy on C-reactive protein and HDL in serum of subjects with periodontitis. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 29, n. 1, p. 69-77, 2014.

LIMA, M. R.; LOPES, A. P.; MARTINS, C.; BRITO, G. A. C.; CARNEIRO, V. C.; GOES, P. The effect of *Calendula officinalis* on oxidative stress and bone loss in experimental periodontitis. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 440, 2017.

LIU, R.; LI, N.; LIU, N.; ZHOU, X.; DONG, Z-M.; WEN, X-J.; Liu, L-W. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 3, p. BR95, 2012.

LIU, Z.; LIU, Y.; SONG, Y.; ZHANG, X.; WANG, S.; WANG, Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. **Disease Markers**, v. 2014, 2014.

LOTANKAR, A. R.; MOMIM, A. J.; WANKHEDE, S.; SHARMA, J. B. Anti-inflammatory activity of an ornamental plant *Plumeria obtusa*. **Advances in pharmacology and pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 23-26, 2016.

LOURENÇO, M.; BERNARDI, A. C. A.; LUNARDI, N.; NETO, R. J. B.; BERNARDI, P. S. M.; BOECK, E. M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) and Coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil extracts on *Streptococcus mutans*. **Journal of Research in Dentistry**, v. 5, n. 2, p. 40-45, 2018.

MARINHO, C. R.; PEREIRA, R. A. S.; PENG, Y-Q; TEIXEIRA, S. P. Laticifer distribution in fig inflorescence and its potential role in the fig-fig wasp mutualism. **Acta Oecologica**, v. 90, p. 160-167, 2018.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; SOUSA, F. B.; FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A. Medicinal species with

gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 1–14, 2015.

MESQUITA, D. D.; CIAPPINA, A. L.; ALMEIDA, L. M. Avaliação do potencial tóxico do látex de *Croton urucurana* (euphorbiaceae). In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE) (ISSN 2447-8687)**. 2017.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 271–278, 1978.

MODH, R. S.; JATHAL, B.; GUPTA, S.; PATEL, V.; SAHAYATA, V. Periodontal diseases contribution to cardiovascular disease: an update on the associations and risk. **Research & Reviews: A Journal of Dentistry**, v. 8, n. 3, p. 18-25, 2018.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 2ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2011.

NAJMADDIN, C.; KHALID, B. A Comparative study of laticiferous canals in five plant species present in Kurdistan Region-Iraq. **ZANCO Journal of pure and applied sciences**, v. 29, n. 4, p. 87-94, 2018.

NASRI, S.GHORBANI, N. M.; AMIN, GH. R.; SHARIFI, A. S.; BORBOR, M. SHAMOHAMMADI, F.; MOGHADDASSI, M. Phytochemical Study of Methanolic Extract of *Ferula persica* Willd. Inflorescence and its Antinociceptive Effect in Male Mice. 2018.

OLIVEIRA, A. P. C. O conhecimento tradicional sobre plantas medicinais no âmbito da saúde da mulher: uma perspectiva no contexto do produto tradicional fitoterápico. 2017.

OLIVEIRA, N. M. V. **Efeito protetor de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) na colite induzida por ácido acético**, Parnaíba, 2018, 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

PALUMBO, A. The anatomy and physiology of the healthy periodontium. In: **Gingival Diseases-Their Aetiology, Prevention and Treatment**. Intech, 2011.

PATHAK, M.; MAHANTA, S. Oral health status and treatment needs among individuals with type ii diabetes mellitus. **Contemporary Research Journal of Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 26-37, 2018.

PAUDEL, N.; ADHIKARI, D. C.; DAS, B. D. Some medicinal plants uses in ethnical group from biratnagar, eastern, Nepal. **American scientific research journal for engineering, technology, and sciences (ASRJETS)**, v. 41, n. 1, p. 233-239, 2018.

PAVONE, C.; NOGUEIRA, A. V. B.; OLIVEIRA, G. J. P. L.; SCARDUELI, C. R.; CERRI, P. S.; JR, E. M.; MARCANTONIO, R. A. C. Treatment of periodontal disease with an Er, Cr: YSGG laser in rats exposed to cigarette smoke inhalation. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 8, p. 2095-2103, 2015.

PEREIRA, K. C.; DE SOUZA, A. B. Efeitos deletérios da prótese parcial removível em pacientes periodontais. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 1, 2018.

PESSOA, L. S.; SILVA, P. F. R.; ALVES, E. H. P.; FRANÇA, L. F. C.; LENARDO, D. CARVALHO, J. S.; MARTINS, V. B. D.; SOUSA, F. B. M.; DRUMOND, K. O.; MEDEIROS, J-V. R.; OLIVEIRA, J. S.; VASCONCELOS, D. F. P. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 23, n. 3, p. e269, 2018.

PIMENTEL, S. P.; BARRELLA, G. E.; CASARIN, R. C. V.; CIRANO, F. R.; CASATI, M. Z.; FOGGIO, M. A.; FIGUEIRA, G. M.; RIBEIRO, F. V. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 224, 2012.

PINHEIRO, R. N.; RODRIGUES, I. S. C. Correlação do tabagismo e doença periodontal de um subgrupo de pacientes da clínica odontológica da Unicatólica. **Mostra Científica do Curso de Odontologia**, v. 1, n. 1, 2017.

PINTO, M. C. S. **Efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria caudata* em ratos no modelo de periodontite induzida por ligadura**, Parnaíba, 2016, 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí.

PORTO, E. L.; BARBOSA, J. F. Reabsorção dentária: Revisão de literatura. **Revista Uningá Review**, v. 24, n. 2, 2018.

PRASAD, W. W. C.; VIRAJ, M. P. M.; PHILIP, R. RANI, J. BN, S.; PRASAD, G. Extraction of acetylcholine esterase inhibitors from plumeria pudica and analyzing its activity on zebrafish brain. 2016.

PRESTES, A. P.; MACHADO, W. M.; OLIVEIRA, J. G.; OLCANHESKI, L. R. SANTOS, F. A.; ALVES, G. F.; PRUDENTE, A. S.; OTUKI, M. F.; PALUDO, K. S.; SORDI, R.; FERNANDES, D. Experimental periodontitis in rats potentiates inflammation at a distant site: Role of B 1 kinin receptor. **Life sciences**, v. 194, p. 40-48, 2018.

RAO, Y. V.; RAJU, M. Antioxidant and protease activities of seven native plant sources. **International Journal of Bio-Resource & Stress Management**, v. 7, n. 6, 2016.

RATHNAVELU, V.; ALITHEEN, N. T.; SOHILA, S.; KANAGESAN, S.; RAMESH, R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. **Biomedical reports**, v. 5, n. 3, p. 283-288, 2016.

RATHOD, S.; SHORI, T.; SARDA, T. S.; RAJ, A.; JADHAY, P. Comparative analysis of salivary sialic acid levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic periodontitis patients: A biochemical study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 29, n. 1, p. 22, 2018.

RIBEIRO, D. S. F.; FREIRE, J. M. O.; TEIXEIRA, A. H.; VAL, D. R.; FREITAS, A. R.; GOMES, F. I. F.; SILVA, A. A. R.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S.; SANTOS, H. P.; AVILA, F. N.; PEREIRA, K. M. A.; GOES, P.; PINTO, V. P. T.; CRISTINO-FILHO, G.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M. Tocoyena sellowiana extract decreases bone loss in an experimental model of periodontitis in rats: Putative role for

cyclooxygenase-2 and IL-1 β inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 863-872, 2018.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RICUCCI, D.; LOGHIN S.; GONÇALVES, L. S.; ROÇAS, I. N.; JUNIOR, J. F. S. Histobacteriologic conditions of the apical root canal system and periapical tissues in teeth associated with sinus **Tracts. Journal of endodontics**, 2018.

ROMERO, F. F. P.; HERNÁNDEZ, L. J. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. **Revista de Salud Pública**, v. 20, p. 258-264, 2018.

ROSSAINT, J.; MARGRAF, A.; ZARBOCK, A. Role of platelets in leukocyte recruitment and resolution of inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

SALEEM, U.; AHMAD, B.; AHMAD, M.; HUSSAIN, K.; BUKHARI, N. I. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 4, p. 322-328, 2015.

SALIM, M. N.; MASYITHA, D.; HARRIS, D.; BALQIS, U.; ISKANDAR, C. D.; HAMBAL, M.; DARMAWI. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* Linn. latex in cream formulation on CD68 expression in mice skin wound. **Veterinary World**, v. 11, n. 2, 2018.

SANTANA, L. A. B.; ARAGÃO, D. P.; ARAÚJO, T. S. L.; SOUSA, N. A.; SOUSA, L. K. M.; OLIVEIRA, L. E. S., PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; OLIVEIRA, N. V. M.; SOUZA, B. S.; SOUSA, F. B. M.; RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; MEDEIROS, J. V-R.; OLIVEIRA, J. S. et al. Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1147-1154, 2018.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 24, p. 192-205, 1968.

SEN, S.; GIAMBERARDINO, L. D.; MOSS, K.; MORELLI, T.; ROSAMOND, W. D.; GOTTESMAN, R. F.; BECK, J.; OFFENBACHER, S. Periodontal disease, regular dental care use, and incident ischemic stroke. **Stroke**, v. 49, n. 2, p. 355-362, 2018.

SHAW, L.; HARJUNMAA, U.; DOYLE, R.; MULEWA, S.; CHARLIE, D.; MALETA, K.; CALLARD, R.; WALKER, A. S.; BALLOUX, F.; ASHORN, P.; KLEIN, N. Distinguishing the Signals of Gingivitis and Periodontitis in Supragingival Plaque: a Cross-Sectional Cohort Study in Malawi. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 82, n. 19, p. 6057-6067, 2016.

SILVA, E.; PONCETTI, J. C. Reconstrução da papila interdental. **Revista Uningá**, v. 51, n. 1, 2018.

SOUZA, B. S. **Avaliação toxicológica das proteínas do látex da *Plumeria pudica* em modelo de camundongos**, Parnaíba, 2018, 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí.

SUAREZ, S. N.; SANAHUJA, G.; LOPEZ, P.; CALDWELL, D. L. First confirmed report of powdery mildew (*Erysiphe* sp.) on *Plumeria pudica* in the United States. **New Disease Reports**, v. 36, p. 3-3, 2017.

SUGIYAMA, L.; BUSHE, B. C.; HELLER, W.P.; KEITH, L. M. First report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial leaf blight of *Plumeria pudica* in Hawaii. **Plant Disease**, n. ja, 2017.

TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; IRIE, K.; AZUMA, T.; TAMAKI, N.; TAKAYUKI, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.; MORITA, M. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs rats. **BIOMEDICAL RESEARCH**, v. 32, n. 5, p. 343-349, 2011.

TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; YAMANAKA, R.; KUSANO, H.; AZUMA, T.; SANBE, T.; TAMAKI, N.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 10, p. 1999-2006, 2007.

TONETTI, M. S.; D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; DONALD, A.; STORRY, C.; PARKAR, M.; SUVAN, JEAN.; HINGORANI, A. D.; VALLANCE, P.; DEANFIELD, J. Treatment of periodontitis and endothelial function. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 9, p. 911-920, 2007.

URS, A. P.; MANJUPRASANNA, V. N.; RUDRESHA, G. V.; YARISWAMY, M.; VISHWANATH, B. S. Plant latex proteases: natural wound healers. In: **Proteases in physiology and pathology**. Springer, Singapore, 2017. p. 297-323.

VARONI, E. M.; VIJAYAKUMAR, S.; CANCIANI, E.; COCHIS, A.; DE NARDO, L.; LODI, G.; RIMONDINI, L.; CERRUTI, M. Chitosan-based trilayer scaffold for multitissue periodontal regeneration. **Journal of dental research**, p. 0022034517736255, 2017.

VASCONCELOS, D. F. P.; SILVA, F. R. P.; PINTO, M. S. C.; SANTANA, L. A. B.; SOUZA, I. G.; SOUZA, L. K. M.; OLIVEIRA, N. C. M.; VENTURA, C. A.; NOVAES, P. D.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS J-V. R.; MIKOLASEVIC, I.; MANI, A.; OLIVEIRA, J. S. Decrease of pericytes is associated with liver disease caused by ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 88, n. 2, p. e49-e57, 2017.

VASCONCELOS, D. F. P.; SILVA, M. A. D.; MARQUES, M. R.; GILIBINI, C.; VASCONCELOS, A. C. C. G.; BARROS, S. P. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric study. **J Clin Exp Dent**, v 5, p. 95-9, 2013.

VIANA, C. A.; RAMOS, M. V.; FILHO, J. D. B. M.; LOTUFO, L. V. C.; FIGUEIREDO, I. S. T.; DE OLIVEIRA, J. S.; MAESTRONI, P.; LIMA-FILHO, J. V.; ALENCAR, N. M. N. Cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties of chitinases from *Calotropis procera* latex. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 10, p. 1005-1013, 2017.

WANG, Y.; ANDRUKHOV, O.; RAUSCH-FAN, X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 910, 2017.

WEI, D.; ZHANG, X-L.; WANG, Y-Z.; YANG, C-X.; CHEN, C. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. **Australian Dental Journal**, v. 55, n. 1, p. 70-78, 2010.

WELLS, E.; ROBINSON, A. S. Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. **Biotechnology journal**, v. 12, n. 1, 2017.

WIDITA, E.; YOSHIHARA A.; HANINDRIYO L.; MIYAZAKI H. Relationship between clinical periodontal parameters and changes in liver enzymes levels over an 8-year period in an elderly Japanese population. **Journal of clinical periodontology**, v. 45, n. 3, p. 311-321, 2018.

YOSHIHARA-HIRATA, C.; YAMASHIRO, K.; YAMAMOTO, T.; AOYAGI, H.; IDEGUCHI, H.; KAWAMURA, M.; SUZUKI, R.; ONO, M.; WAKE, H.; NISHIBORI, M.; TAKASHIBA, S. Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model. **Infection and immunity**, v. 86, n. 5, p. e00111-18, 2018.

ZHAI, J.; HAO, H.; XIAO H. Identification of JAZ-interacting MYC transcription factors involved in latex drainage in *Hevea brasiliensis*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 909, 2018.

ZHANG, Q.; WANG, D.; ZHANG, H.; WANG, M.; LI, P.; FANG, X.; CAI, X. Detection of autophagy processes during the development of nonarticulated laticifers in *Euphorbia kansui* Liou. **Planta**, p. 1-17, 2017.

ZHANG, W.; JU, J.; RIGNEY, T.; TRIBBLE, G. Porphyromonas gingivalis infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. **BMC oral health**, v. 14, n. 1, p. 89, 2014.

ZHOU, T.; CHEN, D.; LI, Q.; SUN, X.; SONG, Y.; WANG, C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 2, p. 349-356, 2013.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



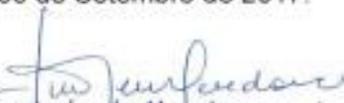
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos para esteatose causada pela periodontite induzida em animais**", registrada nº 385/17, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS** do **Departamento de Biomedicina_ 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 **08/09/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/2018 à Janeiro/ 2022
Espécie/Linhagem/raça	Rato isogênico/ wistar
Nº de Animais	70
Peso/ Idade	200g/ 12 sem.
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 08 de Setembro de 2017.


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