



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



ANY CAROLINA CARDOSO GUIMARÃES VASCONCELOS

**Análise dos efeitos orais e hepáticos do alfa-terpineol complexado com
beta-ciclodextrina no modelo de periodontite induzida em ratos**

Parnaíba-PI

2019

ANY CAROLINA CARDOSO GUIMARÃES VASCONCELOS

**Análise dos efeitos orais e hepáticos do alfa-terpineol complexado com
beta-ciclodextrina no modelo de periodontite induzida em ratos**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí (UFPI)
campus Ministro Reis Velloso para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia, na área de concentração
Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aldeídia Pereira de Oliveira

Parnaíba-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

V331a Vasconcelos, Any Carolina Cardoso Guimarães.
Análise dos efeitos orais e hepáticos do alfa-terpineol
complexado com beta-ciclodextrina no modelo de periodontite
induzida em ratos / Any Carolina Cardoso Guimarães
Vasconcelos. – 2019.
125 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2019.
“Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aldeídia Pereira de Oliveira”.

1. Periodontite. 2. Inflamação. 3. Óleos essenciais.
4. Estresse oxidativo. 5. 2-Hidroxipropil-beta-Ciclodextrina.
6. Fígado. I. Título.

CDD 615.1

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos

TÍTULO DO PROJETO: “Análise dos efeitos orais e hepáticos do alfa-terpineol complexado com beta-ciclodextrina no modelo de periodontite induzida em ratos.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Aldeidia Pereira de Oliveira - UFPI (Presidente)	<u>Aprovada</u>	<u>Aldeidia</u>
Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa - UFPI (Examinador)	<u>Aprovada</u>	<u>André</u>
Prof. Dr. Jilson Ramos de Jesus - UFBA (Examinador)	<u>Aprovada</u>	<u>Jilson</u>
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva – UFPI (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u>Durcilene</u>
Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovada</u>	<u>Leiz Maria Costa Veras</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 11 de março de 2019.

HORÁRIO: 15h

LOCAL: Sala de reuniões da Universidade Federal do Piauí, campus Ministro Reis Veloso (Parnaíba-PI)

*“Pois o Senhor é quem dá a sabedoria; de sua boca
precedem o conhecimento e o discernimento”.*

Pv. 2-6.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que tanto me ama, toda Honra e Glória, pela sua infinita graça, amor incondicional e misericórdia para comigo.

À minha família, minha base sempre presente: meus pais, pelo carinho, cuidado, orações e por acreditar no meu potencial; ao meu filho, que faz tudo ter sentido na minha vida; e ao meu marido e companheiro pelo amor, paciência e dedicação. Obrigada por não ter permitido que eu desistisse deste projeto. Você é um verdadeiro instrumento de Deus nessa trajetória.

À Prof^a. Dr^a. Aldeídia Pereira de Oliveira, que mesmo sem me conhecer previamente creditou a mim este desafio e que ao longo do tempo me ensinou muito mais do que ciência, mas como ser uma pessoa humilde, humana e profissional de excelência.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) que, provendo-me da estrutura física e acadêmica, em muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos incansáveis integrantes do Laboratório de Preparação e Análise Histológica (LAPHIS), em atenção ao Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Even Herlany Pereira Alves, David di Leonardo, Luiz Felipe e Larissa S. Pessoa pelo auxílio na realização dos experimentos e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao Prof. Dr. Lucindo José Quintanas-Júnior e equipe de laboratório da Universidade Federal de Sergipe, pela disponibilização do complexado que constituem o eixo principal deste trabalho. Aos professores Pedro Duarte Novaes e Flávia S. Mariano da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, *campus* da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), pelo apoio com o processamento dos tecidos para as análises com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

À Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde do Piauí do Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba (FAHESP/IESVAP) e toda equipe de trabalho, desde aos colaboradores até aos discentes, por me auxiliar e compreender minhas ausências para a conclusão dessa capacitação e projeto.

Aos Profs. Drs. membros desta banca, pelas relevantes contribuições na melhoria deste trabalho.

Finalmente, a todos que, mesmo indiretamente, tenham estimulado o alcance deste objetivo pessoal e profissional.

RESUMO

A periodontite é uma doença infecciosa e imunoinflamatória multifatorial que, além de comprometer progressivamente a integridade do periodonto, pode causar danos remotos, incluindo alterações hepáticas. Essa correlação reforça a necessidade de desenvolver tratamentos novos e eficazes. Assim, o alfa terpineol (α -TPN), um monoterpene álcool derivado de óleos essenciais, em complexação com beta ciclodextrina (β -CDs), promove um efeito possivelmente benéfico na terapêutica adjuvante da periodontite por suas conhecidas propriedades biológicas, bioquímicas e tecnológicas. Neste trabalho, o objetivo foi investigar a ação anti-inflamatória e antioxidante proporcionada pelo α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs em modelo experimental de periodontite induzida em ratos mediante análise dos parâmetros orais, sanguíneos e hepáticos. Quanto aos parâmetros clínicos foi analisado o índice de sangramento gengival, mobilidade dental e profundidade de sondagem. Altura óssea alveolar e mieloperoxidase (MPO) gengival também foram observadas e analisadas. Avaliação da fosfatase alcalina (FAL) por reação de imunohistoquímica foi realizada em amostras do fígado para verificar o dano hepático causado pela periodontite. A ação do complexado foi analisada histopatologicamente e morfometricamente no fígado. Marcadores de inflamação tais como a MPO e citocinas do grupo de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) e de estresse oxidativo pelas dosagens de malondialdeído (MDA); glutathiona reduzida (GSH), nitritos e nitratos foram quantificados. Parâmetros bioquímicos no sangue como a lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, colesterol total, gama glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glicose foram analisados. Dos parâmetros hepáticos, foi considerada a massa corporal hepática, a análise histopatológica do fígado e de ultraestrutura do hepatócito por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Desta análise, os animais induzidos com a periodontite apresentaram as seguintes alterações: significativo aumento no número de hepatócitos binucleados e FAL positivos, aumento no tamanho e número das vesículas lipídicas (VLs), aumento na distância entre as cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), aumento no tamanho das mitocôndrias, *foamy* citoplasmático e acúmulo de glicogênio. O tratamento tanto do α -TPN isolado quanto dessa mesma molécula complexada com β -CD melhoraram significativamente vários parâmetros orais comparado com os animais não tratados. Além disso, o tratamento com o α -TPN isolado e complexado com β -CD diminuiu o escore de esteatose dos ratos com periodontite. O complexado demonstrou ação promissora quanto à melhora significativa nos parâmetros clínicos orais com diminuição da inflamação e nos indicativos de estresse oxidativo. Além disso, a microesteatose causada pela periodontite foi amenizada nos ratos tratados quando o complexado, destacando que a β -CD melhorou as propriedades do α -TPN.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Óleos essenciais. Estresse oxidativo. 2-Hidroxiopropil-beta-Ciclodextrina. Fígado.

ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial infectious and immunoinflammatory disease that, in addition to progressively compromising the integrity of the periodontium, can cause remote damage, including liver damage. This correlation reinforces the need to develop new and effective treatments. Thus, alpha terpineol (α -TPN), a monoterpene alcohol derived from essential oils, in complexation with β -cyclodextrin (β -CDs), promotes a potentially beneficial effects on adjuvant periodontitis therapy because of its known biological, biochemical and technological properties. In this work, the objective was to investigate the anti-inflammatory and antioxidant action provided by α -TPN isolated and α -TPN complexed with β -CDs in experimental model of periodontitis induced in rats by analysis of oral, blood and liver parameters. Regarding clinical parameters, gingival bleeding index, dental mobility and depth of probing were analyzed. Alveolar bone height and gingival myeloperoxidase (MPO) were also observed and analyzed. Evaluation of alkaline phosphatase by immunohistochemical reaction was performed in liver samples to verify the liver damage caused by periodontitis. The complex was analyzed histopathologically and morphometrically in the liver. Inflammatory markers such as MPO and cytokines from the group of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1 beta (IL-1 β) and from oxidative stress by the doses of malondialdehyde (MDA); reduced glutathione (GSH), nitrites and nitrates were quantified. Biochemical parameters in the blood such as high density lipoprotein (HDL), triglycerides, total cholesterol, gamma glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and glucose were analyzed. Hepatic parameters, hepatic body mass, histopathological analysis of the liver and hepatocyte ultrastructure were considered by transmission electron microscopy (TEM). From this analysis, animals induced with periodontitis presented the following alterations: a significant increase in the number of binucleated and FAL positive hepatocytes, increase in the size and number of lipid vesicles (VLs), increase in the distance between the cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER), increase in size of mitochondria, foamy cytoplasm and accumulation of glycogen. Treatment of both α -TPN alone and that same β -CD complexed molecule significantly improved several oral parameters compared to animals with periodontitis. In addition, treatment with α PTN isolated and complexed with β -CD decreased the steatosis score of untreated animals. The complex showed promising action regarding the significant improvement in oral clinical parameters with decreased inflammation and indicative of oxidative stress. In addition, the microsteidosis caused by periodontitis was attenuated in the treated rats when complexed, noting that β CD improved the properties of α -TPN.

Keywords: Periodontitis. Inflammation. Essencial oils. Oxidative stress. 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin. Liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa representando as estruturas anatômicas do periodonto e dente.....	17
Figura 2. Imagem representativa do biofilme simbiótico e homeostase do hospedeiro no periodonto normal; das alterações inflamatórias e do tecido ósseo na gengivite e periodontite e da disbiose do biofilme periodontal.....	21
Figura 3. Esquema ilustrativo do dano remoto hepático da periodontite, evidenciando as alterações a partir da liberação das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-1, IL-10, IL-6 e TNF- α), MPO, de marcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica (GSH e MDA) em resposta aos periodontopatógenos como a <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> e <i>P. intermedia</i>	28
Figura 4. Esquema representativo sobre as atividades químicas e biológicas evidenciadas nos estudos com o α -terpineol.....	34
Figura 5. Esquema representativo das três classes de ciclodextrinas (α -CD; β -CD e γ -CD) e dos aspectos bioquímicos de superfície hidrofílica e cavidade hidrofóbica das CDs.....	36
Figura 6. Imagem representativa do modelo de indução experimental da periodontite em ratos utilizando fio de nylon ao redor do primeiro molar inferior.....	37

Capítulo I

Figura 1. Parâmetros orais (índice de sangramento gengival, mobilidade dentária e níveis de MDA e MPO gengivais) e avaliação da altura óssea alveolar e profundidade de sondagem.....	46
Figura 2. Imagens histopatológicas do fígado e análise Imunohistoquímica para FAL.....	49
Figura 3. Avaliação ultraestrutural dos hepatócitos por MET.....	51
Figura 4. Avaliação ultraestrutural dos RER e mitocôndrias dos	

hepatócitos por MET.....	52
Figura 5. Avaliação ultraestrutural por MET do REL e citoplasma dos hepatócitos.....	53

Capítulo II

Figura 1. Parâmetros clínicos (ISG, PS, MD) do grupo periodontite e dos grupos tratados com α -TPN/ β -CD.....	69
Figura 2. Níveis de MPO e MDA do grupo periodontite e dos grupos tratados com α -TPN/ β -CD.....	70
Figura 3. Avaliação do osso alveolar do grupo periodontite e dos grupos tratados com α -TPN/ β -CD.....	71
Figura 4. Avaliação histopatológica do fígado.....	75
Figura 5. Avaliação ultraestrutural do hepatócito com MET.....	79

Capítulo III

Figura 1. Curva de CED do α -TPN, β -CD e do α -TPN/ β -CD em atmosfera dinâmica de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.....	91
Figura 2. Curva de TG/TGD do α -TPN, β -CD e do α -TPN/ β -CD em atmosfera dinâmica de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min....	92
Figura 3. Avaliação do osso alveolar e tecido hepático.....	95
Figura 4. Avaliação histopatológica do fígado dos animais.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

α-TPN	alfa-terpineol
β-CD	beta-ciclodextrina
μTC	micro-tomografia
AST	aspartato aminotransferase
ALT	alanina aminotransferase
AOA	altura óssea alveolar
CT	colesterol total
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	espécie reativa de oxigênio
FAL	fosfatase alcalina
GSH	glutathiona reduzida
GGT	gama glutamiltransferase
HDL	lipoproteína de alta densidade
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LPD	ligamento periodontal
MD	mobilidade dentária
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mGSH	glutathiona mitocondrial-reduzida
MMP	metaloproteinases de matriz
MPO	mieloperoxidase
MDA	malondialdeído
OA	osso alveolar
PGE2	prostaglandina E2
PS	profundidade de sondagem
RER	retículo endoplasmático rugoso
REL	retículo endoplasmático liso
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
Tri	triglicerídeos
VL	vesículas de lipídeos
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Parâmetros de massa e marcadores sanguíneos e hepáticos.....	48
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Parâmetros de massa (peso) e biomarcadores sanguíneos hepáticos.....	73
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Dados comparativos dos parâmetros de massa, orais, hepáticos e sanguíneos entre os animais do grupo controle e com indução da periodontite tratados com α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs.....	93
Tabela 2. Parâmetros de peso, orais, hepáticos e sanguíneos.....	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 <i>Tecidos periodontais</i>	17
3.2 <i>Periodontite: fisiopatologia</i>	20
3.3 <i>Periodontite e alterações hepáticas remotas</i>	24
3.4 <i>Moduladores farmacológicos das respostas do hospedeiro</i>	28
3.5 <i>Plantas medicinais e a periodontite</i>	31
3.5.1 <i>Óleos essenciais</i>	32
3.5.2 <i>Alfa-terpineol complexado com β-ciclodextrina</i>	33
3.6 <i>Modelo animal da periodontite</i>	36
4. CAPÍTULO I.....	38
5. CAPÍTULO II.....	61
6. CAPÍTULO III.....	85
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
8. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	121
ANEXO A.....	121
ANEXO B.....	122
ANEXO C.....	123
ANEXO D.....	124

1 INTRODUÇÃO

Segundo a *Global Burden of Diseases Study*, a periodontite, uma doença inflamatória que progressivamente afeta os tecidos de sustentação e proteção dos dentes, tem acometido 11% da população mundial em seus estágios mais avançados (PETERSEN; OGAWA, 2012; RICHARDS, 2014). No Brasil, corresponde à segunda doença oral mais prevalente, sendo considerado um problema preocupante para a saúde pública (BRASIL, 2012; DALYS et al, 2016).

O processo da periodontite se inicia pela interação entre os microrganismos e seus subprodutos na região gengival e a resposta imune do hospedeiro. Como consequência, ocorre destruição dos tecidos de suporte do dente, levando a perda do osso alveolar. A progressão da periodontite geralmente é lenta, podendo apresentar períodos de progressão rápida (XUE; YU; CHEN, 2018).

Fatores genéticos, imunológicos, ambientais e comportamentais contribuem para uma variação na susceptibilidade e evolução da periodontite (GOODSON et al., 2012). Neste contexto, diversos mediadores já foram identificados em quantidades alteradas no curso da doença: as citocinas, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-1-beta (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α); as prostaglandinas E2 (PGE2); as metaloproteinases de matriz (MMPs); os fatores de crescimento e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (AIRILA-MANSSON et al., 2006; PRESHAW et al, 2017). Outrora, novos achados científicos têm mostrado que por intermédio desses mediadores, a periodontite pode se apresentar como causa primária de doenças sistêmicas tendo efeitos não apenas locais no periodonto, como também em diferentes tecidos, com evidências mais robustas no fígado (VASCONCELOS et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2017).

O tratamento não cirúrgico, orientação de higiene oral, controle da placa, raspagem supra e subgengival e alisamento radicular, corresponde à abordagem convencional mais usada na clínica da periodontite (HEITZ MAYFIELD; LANG, 2013). Coadjuvantes a essas condutas se utilizam agentes ou drogas antimicrobianas, terapia a laser e os moduladores das respostas do hospedeiro (ZHOU et al., 2018). Entretanto, problemas quanto aos efeitos colaterais, resistência bacteriana e efetividade na regeneração do periodonto ainda são fatores limitantes e desafiadores na área (TEIXEIRA et al., 2017).

O custo anual da terapia periodontal nos Estados Unidos da América ultrapassa US \$ 14 bilhões (BROW; JOHNS; WALL, 2002) e a associação de periodontite com condições sistêmicas ressalta a importância de padronizar opções de tratamento novos e eficazes. No Brasil, dados quanto ao custo, efetividade e custo-efetividade do tratamento e manutenção periodontal são escassos e praticamente inexistentes na literatura científica, principalmente em relação ao custo e consequências das terapias alternativas (MAROSO, 2015). Assim, a busca por novos e seguros agentes terapêuticos tentam superar diversas limitações.

A motivação pelos estudos de compostos derivados de plantas se deve pelas propriedades promissoras que as mesmas apresentam, sendo considerada fonte de inovação em saúde. Além disso, há vantagens quanto ao custo, disponibilidade e possível obtenção em larga escala, principalmente em países como o Brasil que detém 15% a 20% da biodiversidade do mundo (BRASIL, 2016).

Entre os elementos que constituem a biodiversidade, os óleos essenciais derivados de plantas aromáticas se destacam por apresentar amplo espectro de atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana, antioxidantes, antinociceptiva, dentre outras (BAKKALI et al., 2008; PARK et al., 2012; ANJOS et al., 2017; PINA et al., 2018). Os monoterpenos ou terpenos, o mais importante substrato dos óleos essenciais vegetais, são compostos voláteis com grande diversidade de aromas e sabores (BAKKALI et al., 2008).

Diversos estudos envolvendo o potencial terapêutico dos terpenos têm sido demonstrados na literatura, em especial, sobre o isômero alfa-terpineol (α -TPN), um álcool monoterpênico isolado naturalmente de uma variedade de plantas tais como os da Família Myrtaceae (ex. do *Eucalyptus globulos*), Lamiaceae (ex. o *Origanum vulgare*, conhecido como “orégano”) e Euphorbiaceae (ex. *Croton sonderianus*, encontrado no nordeste do Brasil como “marmeleiro negro”) (QUINTANS-JUNIOR et al., 2011; OLIVEIRA, et al., 2016; PARVARDEH et al., 2016). Sobre suas atividades biológicas, há evidências científicas para efeitos anti-hiperalgésicos (OLIVEIRA, et al., 2016), anti-inflamatórios (RODRIGUES et al., 2017), antibacterianos (LI et al., 2014) e antioxidantes (GOUVEIA et al., 2018). Neste sentido, o α -terpineol se apresenta como um potencial agente coadjuvante no tratamento da periodontite. Entretanto, suas características

desafiam a administração por ser insolúvel em água e se apresentar com baixa disponibilidade (RODRIGUES et al., 2017), necessitando, assim, de um ambiente de proteção para manter suas propriedades físico-químicas e estruturais (PINHO et al., 2014).

As beta-ciclodextrinas (β -CDs) são oligossacarídeos cíclicos estruturalmente organizados com sete unidades de glicose para receber moléculas hidrofóbicas em seu interior lipofílico. Ademais, apresentam propriedades complexantes, capazes de aumentar a solubilidade, dissolução, biodisponibilidade e segurança de fármacos poucos solúveis em água como o α -TPN (LIMA et al. 2016). Tendo em vista o que foi exposto, a complexação β -CDs e α -TPN assume um impacto possivelmente benéfico na terapêutica da periodontite como potencial anti-inflamatório e antioxidante.

Assim, o presente estudo buscou analisar os efeitos do α -TPN complexado com β -CDs no modelo de periodontite induzida com fio de nylon em ratos. Após o protocolo de indução de periodontite, amostras de sangue e dos tecidos gengivais e hepáticos dos animais foram utilizadas para a investigação de parâmetros clínicos, bioquímicos, morfométricos, histológicos, inflamatórios e de estresse oxidativo. Além disso, análises de segmentos hepáticos do grupo de animais induzidos com a periodontite foram realizadas para descrever ultraestruturas por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os achados encontrados neste trabalho estão dispostos em três capítulos, originados de artigos científicos publicados ou submetidos em periódicos internacionais de relevância científica (ANEXO A, B e C), após aprovação do projeto junto a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) (ANEXO D). Admite-se que tais evidências sejam importantes para nortear o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e farmacológicas para o tratamento da periodontite. O primeiro capítulo se refere aos resultados sobre alterações causadas pela periodontite na função e estrutura hepática usando um modelo experimental, que trazem embasamentos para futuras investigações relacionadas aos efeitos sistêmicos que a periodontite ocasiona, especialmente no fígado. O segundo capítulo apresenta os resultados da análise dos parâmetros clínicos, bioquímicos, histológicos e morfométricos do α -TPN complexado com β -CDs na periodontite induzida por ligadura em ratos quando comparados com grupo controle, quanto aos efeitos orais e hepáticos. E,

finalmente, o terceiro capítulo aborda os dados comparativos entre os grupos de tratamento com α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs na periodontite experimental mediante os efeitos sobre os tecidos orais e hepáticos.

2 OBJETIVOS

Objetivou-se neste trabalho verificar a ação anti-inflamatória e antioxidante proporcionada pelo α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs em modelo experimental de periodontite induzida em ratos nos parâmetros orais, sanguíneos e hepáticos. Para isso, as metas resumiram-se em:

- a) Descrever os parâmetros clínicos quanto ao índice de sangramento gengiva (ISG), mobilidade dentária (MD), profundidade de sondagem (OS) e altura óssea alveolar (AOA) da periodontite induzida por ligadura nos grupos controle (periodontite sem tratamento) e nos grupos de periodontite induzida e tratados com α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs;
- b) Identificar a quantidade de hepatócitos binucleados e os componentes ultraestruturais no fígado de animais com periodontite induzida por ligadura mediante a técnica de MET;
- c) Avaliar a atividade da fosfatase alcalina utilizando a reação de imunohistoquímica em amostras de fígado de animais com periodontite induzida por ligadura;
- d) Dosar as citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) presentes em amostras de fígado de animais com periodontite induzida por ligadura;
- e) Analisar parâmetros indicativos de estresse oxidativo (presença de grupamentos glutationa, ocorrência de peroxidação lipídica, dosagem de nitritos e nitratos, MPO, MDA e glicose) no fígado de animais com periodontite induzida por ligadura;
- f) Descrever os parâmetros bioquímicos no sangue (HDL, triglicerídeos, colesterol total, GGT, ALT, AST e glicose) e massa corporal hepática nos grupos controle e do grupo de animais com periodontite induzida e tratados com α -TPN complexado com β -CDs; e do AST e ALT no grupo de animais com periodontite induzidos e tratados com α -TPN isolado.
- g) Descrever parâmetros histológicos e morfométricos, gengivais e hepáticos nos grupos controle (periodontite sem tratamento) e do grupo de periodontite induzida e tratados com α -TPN complexado com β -CDs;
- h) Comparar os efeitos do tratamento com α -TPN isolado e α -TPN complexado com β -CDs na periodontite experimental mediante os efeitos sobre os tecidos orais e hepáticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Periodonto: aspectos estruturais

O periodonto (*peri* = em torno de; *odonto* = dente) humano é formado por um conjunto de tecidos especializados que se organizam estruturalmente e funcionalmente para facilitar a ancoragem dos dentes nos maxilares (CHUKKAPALLI; LELE, 2018). São compostos por quatro estruturas: gengiva, osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal (LPD). Esses elementos são responsáveis em oferecer proteção e sustentação ao dente. Em condições normais são subdivididos em periodonto de proteção ou de tecidos moles – constituído pelo complexo mucogengival identificado por três porções, a gengiva livre, interdental e inserida; e periodonto de suporte ou de tecidos duros – constituído pelo osso alveolar, cemento radicular e LPD. (Figura 1) (LANG; LINDHE, 2018).

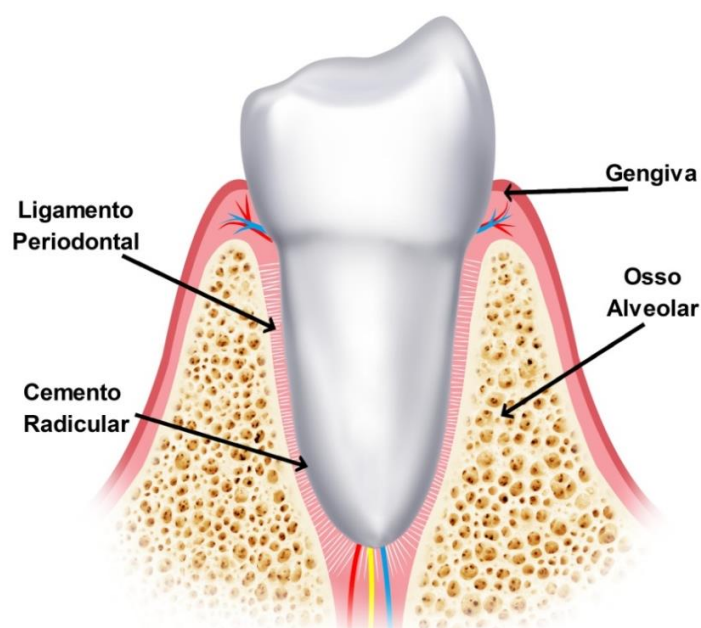


Figura 1. Imagem ilustrativa representando as estruturas anatômicas do periodonto e dente. Fonte: PESSOA, 2017.

Para a manutenção biológica e funcional, o periodonto necessita de uma integridade estrutural de seus componentes, assim como da interação entre eles.

Com a chegada da senilidade, está sujeito às alterações funcionais e de modificações relacionadas com o meio ambiente (NANCI; BOSSHARDT, 2006).

Esses componentes não interagem apenas em condições de tecidos saudáveis, mas também refletem eventos associados a dano, reparo e regeneração tecidual (BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

A junção dentogengival é uma adaptação da mucosa oral que compreende componentes epiteliais e do tecido conjuntivo. O epitélio é dividido em três compartimentos funcionais – o epitélio gengival, sulcular e juncional - e o tecido conjuntivo em superfície e compartimentos profundos sendo formados principalmente por colágenos, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenascina e elastina. Sua integridade é essencial para manter um periodonto saudável (NANCI; BOSSHARDT, 2006). Falhas em algum desses tecidos pode resultar no início do processo inflamatório da gengiva com possível progressão para a periodontite.

O LPD é uma estrutura de tecido conjuntivo rico em fibras de colágenos dos tipos I e III. Apresenta-se ricamente vascularizado, circundando as raízes dos dentes e unindo o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito (LANG; LINDHE, 2018). Suas funções consistem em transmitir as forças oclusais ao osso através do sistema principal de fibras formativa, estrutural, nutritiva e sensorial, favorecer a manutenção e reparação do osso alveolar e cemento, além de controlar a mastigação por meio dos mecanorreceptores (BERKOVITZ, 2004).

Caracterizado como um tecido conjuntivo mineralizado e avascular, o cemento exerce uma atividade de inserção das fibras colágenas do ligamento periodontal que unem o osso alveolar à raiz do dente (HAN et al, 2014). Ele reveste a dentina radicular e tem uma importante função reparadora para as superfícies das raízes, mesmo não apresentando capacidade de remodelação como no tecido ósseo (LANG; LINDHE, 2018). Aproximadamente 45% a 50% do cemento são compostos por hidroxapatita inorgânica enquanto outros 50% são de constituintes de fibras de colágenos da matriz orgânica. A distribuição dessas fibras, intrínseca ou extrínseca, sua origem e a presença ou não de células no cemento, classificam este tecido em celular ou acelular (NANCI; BOSSHARDT, 2006; HAN et al., 2014).

O cemento acelular ou primário está disposto na metade cervical e dois

terços da raiz e da erupção dental e se caracteriza por desenvolvimento lento. Está organizado de modo que as fibras de Sharpey, responsáveis pela ancoragem do dente, se distribuam em sua superfície (NANCI; BOSSHARDT, 2006; LANG; LINDHE, 2018). O principal papel desta porção é direcionar as fibras do LPD na fixação com o dente. Já o cemento celular ou secundário se distribui na metade apical da raiz e nas áreas de furca, sendo marcadas pela presença dos cementócitos, células que ficam aprisionadas na matriz para exercer a nutrição e manutenção vital deste tecido. Diferentemente da parte acelular, se desenvolve de forma mais rápida e é menos mineralizada (HAN et al, 2014).

O osso alveolar (OA), conhecido também como lâmina dura, é um tecido peculiar que se diferencia dos demais tecidos ósseos por sua origem ectomesenquimal, por apresentar intensa remodelação durante o processo eruptivo e sofrer constante ação de forças mecânicas da mastigação (YANG et al., 2015; LANG; LINDHE, 2018). Corresponde a um tecido compacto que delimita a superfície do alvéolo dental para dar sustentação aos dentes. Além disso, exerce papel de proteção, locomoção, absorção de forças e estresse mecânico, bem como reservatório (LANG; LINDHE, 2018). Histologicamente, o OA é considerado um tecido conjuntivo especializado mineralizado constituído por matriz óssea orgânica (33%) e inorgânica (67%) (HAN et al., 2014). A matriz óssea orgânica é formada principalmente por fibras de colágeno, proteoglicanas, glicoproteínas e células específicas, enquanto a matriz inorgânica se constitui predominantemente de cristais de hidroxiapatita no seu estágio mineralizado, compostos principalmente por fósforo e cálcio (YANG et al., 2015).

A estrutura mineralizada do OA sofre constante remodelação pelas ações de osteoblastos produtores de osso e osteoclastos de reabsorção óssea (HAN et al., 2016). A remodelação óssea fisiológica ocorre em resposta à necessidade do organismo responder a alterações de níveis de eletrólitos ou forças mecânicas nos ossos. No entanto, existem muitas condições patológicas que causam um desequilíbrio entre a produção óssea e a reabsorção devido à ação excessiva de reabsorção, resultando em perda óssea. Eventuais situações envolvendo inflamação aguda ou crônica, a exemplo da periodontite, estão frequentemente associadas à perda óssea (TOMPKINS, 2016).

3.2 Periodontite: fisiopatologia

A Periodontite é uma doença infecciosa e imunoinflamatória multifatorial que compromete progressivamente a integridade dos tecidos de proteção e suporte do dente, isto é, gengiva, LPD, cemento e osso alveolar (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Em sua forma severa, chega a atingir 11% da população mundial e, quando relacionadas às doenças periodontais de modo geral, 40% da população adulta (RICHARDS, 2014). Portanto, é uma condição crônica que traz impactos negativos e profundos na qualidade de vida humana, merecendo a atenção da ciência.

Clinicamente, a periodontite é caracterizada por perda de inserção conjuntiva, inflamação com sangramento gengival à sondagem, formação de bolsas periodontais, aumento de mobilidade dental, destruição de tecido de fixação e reabsorção óssea alveolar, podendo levar à perda do dente (TRINDADE et al., 2014). Evidências recentes têm demonstrado que, além disso, a periodontite pode causar importantes efeitos sistêmicos que comprometem a saúde global dos pacientes susceptíveis, aumentando o risco de aterosclerose (EKUNI et al., 2009), artrite reumatoide (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2015), câncer (SHRIHARI et al., 2016) e esteatose microvesicular (VASCONCELOS et al., 2018). Esses achados têm direcionado um novo campo de estudo na área: a medicina periodontal sistêmica (LOSS, 2016).

Historicamente, a periodontite é conhecida desde a antiguidade, quando se tornou prevalente em decorrência da domesticação de plantas nas sociedades neolíticas (\approx 10.000 anos) com a mudança na microbiota oral por aumento da frequência da *Porphyromonas gingivalis* e outras espécies associadas à doença (HAJIHENGALLIS, 2015). Atualmente, outras bactérias periodontopatogênicas anaeróbias são também reconhecidas no processo, como a *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, sendo consideradas como agentes causadores de periodontite, com base em suas propriedades de virulência e forte associação com os sítios de proteção do periodonto (HAJISHENGALLIS, 2014). Entretanto, os fatores determinantes da periodontite não se limitam apenas pela presença ou não dessas bactérias. A resposta imuno-inflamatória do organismo frente à complexa interação com os patógenos microbianos determinam a gravidade das alterações histopatológicas do tecido periodontal e a evolução da periodontite.

Outros potenciais fatores de risco estão bem estabelecidos à doença, tais como os ambientais (higiene oral, uso do tabaco e álcool; procedimentos restauradores dentários e nutricionais) e genéticos (TRINDADE et al, 2014; NAKAJIMA et al, 2016).

Diversos estudos apontam para a invasão bacteriana nos tecidos periodontais como passo relevante na etiopatogenia da doença a partir da ativação do sistema imune inato em resposta à infecção (HAJISHENGALLIS, 2015; MENDES et al., 2015; COLOMBO, 2016). As evidências indicam que a inflamação do tecido gengival precede a periodontite, no entanto, nem todos os casos de gengivite evoluem para a periodontite (DIMISTRIS et al, 2005). Sobre isso, a presença de produtos bacterianos como os polissacarídeos (LPS) e a disbiose oral, um desequilíbrio quantitativo e qualitativo desses agentes em decorrência da alteração gradativa na relação simbiótica entre o hospedeiro-patógeno, bem como as interações polimicrobianas desempenham um papel chave nesse processo (MEYLE; CHAPPLE, 2015). Além disso, a relação entre a comunidade disbiótica e condições sistêmicas como a diabetes e fatores de risco exógenos (por exemplo, tabagismo), conduz à destruição do tecido periodontal (figura 2) (ROBERTS; DARVEAU, 2015).

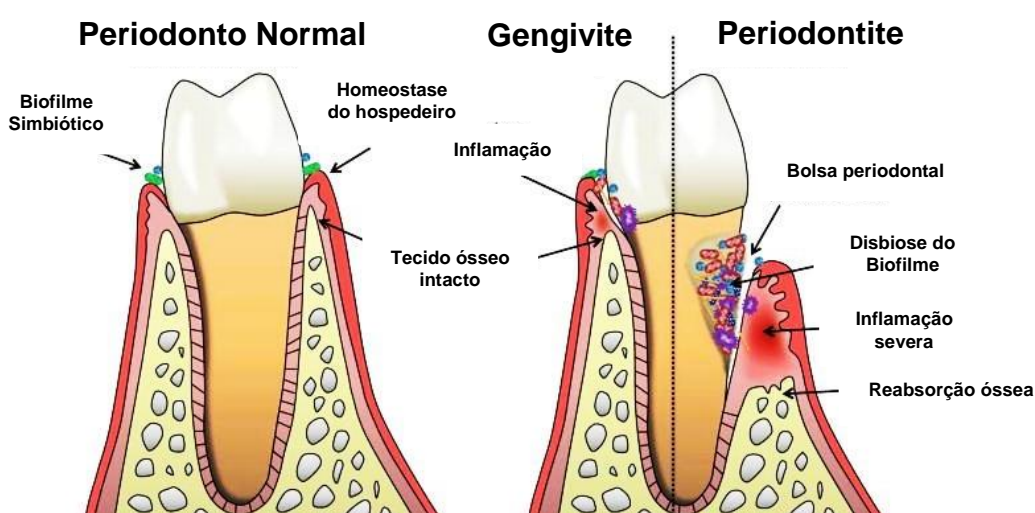


Figura 2. Imagem representativa do biofilme simbiótico e homeostase do hospedeiro no periodonto normal; das alterações inflamatórias e do tecido ósseo na gengivite e periodontite e da disbiose do biofilme periodontal. Fonte: Adaptado de Hajishengalis et al. (2015).

Os macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B, células plasmáticas e perda substancial de colágeno têm sido encontradas nos infiltrados inflamatórios da periodontite que podem estar associados a reações agudas ou crônicas (DIMITRIS et al., 2005). Os principais elementos estruturais e celulares do periodonto que interagem com essas células de defesa do hospedeiro são as células epiteliais, o ligamento periodontal, os fibroblastos gengivais e os osteoblastos e osteoclastos do osso alveolar. Dentre os elementos estruturais moleculares, as interações ocorrem também com os componentes da matriz extracelular, como os colágenos e as proteínas não colagênicas, a exemplo dos proteoglicanos de elastina e de tecido conjuntivo (DIMITRIS et al, 2005; AKRAM et al. 2016). Esses achados estão relacionados ao tipo de resposta imune mediada pelas citocinas que determinam o influxo de leucócitos com atividades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (TRINDADE et al., 2014).

Diversos mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na resposta imunológica da periodontite, incluindo a ação da IL-1 β , IL-6, TNF- α ; PGE2; MMPs; fatores de crescimento e as EROs (AIRILA-MANSSON et al., 2006; PRESHAW et al, 2017) que se encontram aumentados quando analisados na gengiva e sangue. Além disso, pela proximidade anatômica do biofilme periodontal com a corrente sanguínea gengival, bolsas periodontais contendo patógenos microbianos e seus produtos, bem como mediadores inflamatórios e imunocomplexos podem disseminar para outros locais do corpo humano (HAN; WANG, 2013; COLOMBO et al, 2016). Assim, neste trabalho, o enfoque de investigação foi dado na dosagem da IL-1 β e TNF- α do tecido hepático de animais com periodontite. De modo geral, nas doenças hepáticas (doença hepática gordurosa não alcoólica (FURUTA et al., 2010; SOOKOIAN; PIROLA, 2013), esteatohepatite (PARK et al., 2001), cirrose (TRITTO et al., 2011) e câncer hepático esses marcadores estão aumentados (HAN; SUN; YANG, 2016). Entretanto, ainda não se conhecia a influência dessas citocinas na doença do fígado causada pela periodontite induzida em ratos.

Outros importantes estudos têm trazido evidências do efeito da periodontite nas EROs circulantes e estresse oxidativo (TUTER; KURTIS; SERDAR, 2001; TSAI et al., 2005; TÓTHOVA; CELEC, 2017). Isso significa que o desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs, espécies reativas de nitrogênio e radicais livres podem causar a fragmentação do DNA, peroxidação lipídica e

oxidação proteica, levando à perda da integridade da membrana, mudanças estruturais e funcionais proteicas e de lipídeos, assim como de mutações gênicas (NENCINI; GIORGI; MICHELI, 2007; REDDY et al., 2009). Na periodontite, as EROs estão aumentadas em resposta ao recrutamento e ativação dos polimorfonucleares hiper responsivos causados pela ação inflamatória via biofilme subgengival e componente celular bacteriano (TSAI et al., 2005; TÓTHOVA; CELEC, 2017).

Do mesmo modo, na doença hepática gordurosa não alcoólica são amplamente encontradas por consequência de danos teciduais no fígado. A relação disso ocorre por envolvimento das EROs na agressão dos ácidos gaxos polinsaturados (AGPs) durante a peroxidação lipídica no interior das células, provocando, conseqüentemente, a formação de aldeídos como o malondialdeído (MDA) (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). A mieloperoxidase (MPO), enzima intracelular liberada pelos neutrófilos e outras células de defesa, produzem EROs durante a resposta imunológica diante dos agentes patogênicos no periodonto. Assim, no processo infeccioso e inflamatório da periodontite, células como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos são recrutadas, podendo ocasionar danos no tecido por ação de proteases, colagenases e EROs. (LEPPILAHTI et al, 2014).

O MDA, biomarcador comumente empregado para a peroxidação lipídica e de estresse oxidativo, está com os níveis elevados no plasma sanguíneo, em eritrócitos e localmente homogeneizados nos tecidos de pacientes com periodondite (FENTOGLU et al., 2015; YUE et al., 2017) e em animais experimentais com indução da doença (CHAPPLE; MATTHEWS, 2007). Além disso, os níveis de agentes antioxidantes celulares, como a glutathiona reduzida (GSH), responsáveis pela proteção contra o dano oxidativo, podem estar diminuídos (PALWANKAR et al., 2015; YUE et al., 2017).

Outros marcadores séricos que estão alterados na periodontite são o aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Ambos são capazes de identificar lesão hepática, estando aumentados tanto na periodontite como na esteatose e outras doenças hepáticas (TOMOFUJI et al., 2007).

Parte deste trabalho recebeu enfoque nas alterações causadas pela periodontite na função e estrutura hepática usando um modelo experimental. Assim, para compreender seus efeitos, se faz necessária uma abordagem sobre

a correlação dessa doença com as alterações no fígado, seus fatores desencadeantes e estruturas celulares hepáticas envolvidas.

3.3 Periodontite e alterações hepáticas remotas

Além do substancial ônus econômico e impacto negativo que a periodontite pode gerar na qualidade de vida humana, bactérias orais e infecções periodontais têm sido indicadas como potenciais fatores de risco para várias doenças sistêmicas, incluindo as relacionadas ao fígado (HAN; SUN; YANG, 2016; VASCONCELOS et al., 2017). Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para elucidar como esta relação acontece.

O fígado é o maior órgão sólido do ser humano. Suas funções especializadas de lipogênese, gliconeogênese e metabolismo do colesterol são capazes de impactar todos os sistemas fisiológicos (BECHMANN et al, 2012). Ademais, o fígado também é responsável pela remoção de patógenos e antígenos exógenos da circulação sistêmica. Sua posição e vascularização favorecem a degradação de toxinas e resíduos (BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013). Para o exercício de todas essas atividades, o fígado se subdivide em composição de células parenquimatosas, representadas pelos hepatócitos, e de células não parenquimatosas, que consistem em um conjunto diversificado de células, incluindo as células endoteliais hepáticas sinusoidais, células de Kupffer (macrófagos) e células estreladas hepáticas. Dentre essas células, os hepatócitos contribuem com a maior parte das funções secretoras endócrinas e exócrinas do fígado, constituindo 80% da massa celular desse órgão (VU et al., 2017).

Quando observado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), o citoplasma dos hepatócitos se destacam pela presença de mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso, lisossomos e inclusões como glicogênio e gotículas de lipídio (GARTNER; HIATT, 2017). Sua organização celular se faz em cordões, de modo que se orientam radialmente em torno da veia centro-lobular resultando em uma massa poliédrica de tecido hepático. Além disso, os hepatócitos apresentam porções que se comunicam com o espaço de Disse para favorecer a fácil transmissão de moléculas e mediadores celulares pelos vasos sanguíneos

(ALDABA-MURUATO, 2012).

São nos hepatócitos que ocorrem o ciclo endógeno e exógeno de metabolização dos principais lipídeos plasmáticos, o colesterol e triglicerídeos. A via exógena ocorre a partir das gorduras ingeridas nos alimentos que são absorvidas no intestino delgado por emulsificação de ácidos biliares produzidos nos hepatócitos (ALVES; LIMA, 2008). Esses lipídeos, por sua vez, são hidrolisados pelas lipases e transportados na forma de quilomicrons, um tipo de lipoproteína esférica composta de porção lipídica e, outra proteica, formada pelas apoproteínas. Ao chegar à circulação sistêmica, os quilomicrons ligam-se às moléculas de lipase através da apolipoproteína CII, estimulando a ação enzimática e permitindo, assim, a hidrólise dos triglicerídeos até ácidos graxos e glicerol que serão capturados pelos adipócitos ou células musculares. Em seguida, os quilomicrons desligam-se da molécula da enzima, voltando à circulação sanguínea. Entretanto, os seus catabólitos, designados como quilomicrons remanescentes, são capturados pelos hepatócitos através de receptores, incluindo o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), onde serão oxidados ou armazenados para síntese de novos triglicerídeos (MARANHÃO; 2002).

Em relação à via endógena de metabolização dos lipídeos, o mesmo ocorre nos RER dos hepatócitos a partir da formação de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). A função da VLDL consiste no transporte de triglicérides e de colesterol para os tecidos periféricos (EISENBERG et al, 1984; BECHMANN et al., 2012). Anteriormente, na circulação, a VLDL libera os triglicerídeos e por ação da proteína de transferência de colesterol esterificado da lipoproteína de alta densidade (HDL), a VLDL recebe as proteínas apo A, C e E e é convertida, progressivamente, em partículas mais densas de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e, depois, por lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A LDL em indivíduos normais é responsável por transportar 2/3 do colesterol plasmático total aos tecidos extra-hepáticos para fins de atividades de síntese de membranas, de hormônios esteroides nas glândulas adrenais e gônadas e de síntese do VLDL no fígado (BECHMANN et al., 2012).

Outro importante processo realizado no hepatócito é a lipogênese de novo-conversão de carboidrato em lipídeos a partir de acetil-CoA da via glicolítica. Esse processo ocorre para a captação de ácidos graxos livres

resultantes das reações de esterificação com o glicerol para formar triglicerídeos armazenáveis no fígado (TARGHER; BYRNE, 2015).

Estudos têm demonstrado que uma variedade de condições patológicas desempenham importantes alterações nas funções metabólicas do fígado (RAHIME; LANDAVERDE, 2013; TARGHER; BYRNE, 2015). O exemplo disso, o aumento na prevalência de síndromes metabólicas e obesidade têm levado a mudanças fisiopatológicas que causam doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Essa condição é conhecida pela presença da esteatose hepática (EA) que se caracteriza pelo acúmulo de lipídeos (triglicerídeos) no citoplasma e por modificações estruturais e funcionais do núcleo dos hepatócitos. Isso ocorre por mecanismos de oxidação de ácidos graxos, indução de autofagia e produção de EROs. Progressivamente, indivíduos susceptíveis podem evoluir para uma lesão hepática aguda, cirrose ou câncer hepatocelular (BECHAMANN et al., 2012; ARGUELLO et al., 2015).

Os ácidos graxos livres (AGL) são responsáveis por 2/3 do acúmulo de lipídeos nos hepatócitos em condições metabólicas anormais (IOANNOU, 2016). Na esteatose está claramente relacionado à ocorrência de resistência à insulina ao nível dos tecidos hepáticos, muscular e adiposo. Em contrapartida, por vias mitocondriais e lisossomais, ocorre uma beta-oxidação, principalmente nas mitocôndrias, favorecendo a liberação de EROs à medida que esses AGL se acumulam no citoplasma. Além disso, evidências recentes indicam que a disfunção da mitocôndria resultante do acúmulo de colesterol compromete transportadores específicos, incluindo o transporte mitocondrial de GSH. (BELLANTI et al., 2017).

O teor de colesterol mitocondrial é relevante para o transporte de glutathiona mitocondrial-reduzida (mGSH), um antimicrobiano que controla a geração de EROs, disfunção mitocondrial e morte celular. Entretanto, o acúmulo do colesterol em condições anormais leva à diminuição dos níveis de mGSH que sensibilizam os hepatócitos ao estresse oxidativo e ativação de mediadores inflamatórios (ARGUELLO et al., 2015).

Vários modelos experimentais mostraram que o acúmulo de colesterol nas mitocôndrias sensibiliza hepatócitos na ativação da citocina TNF- α levando a depleção de mGSH. (IOANNOU, 2016; BELLANTI et al., 2017) Outros estudos em hepatócitos primários de camundongos com fígado gordo e incubado com

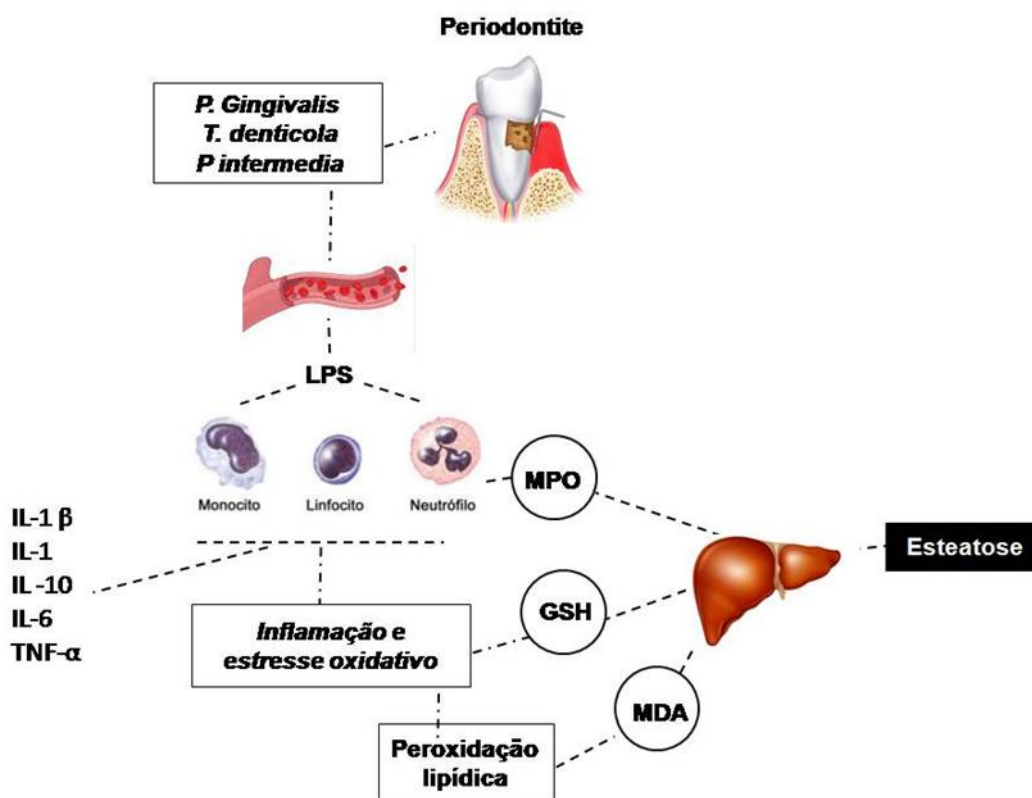
LDL mostrou que a deposição do colesterol mitocondrial causou apoptose e necrose de hepatócitos pela ativação da Via quinase c-Jun N-terminal 1 (JNK1) (YIN et al., 1999). Estes efeitos foram acompanhados pela ativação de transição do poro da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, estresse e depleção de ATP (ARGUELLO et al., 2015).

Para fins de diagnóstico clínico das doenças do fígado, em geral, a análise histopatológica é considerada padrão ouro. Sendo assim, histopatologicamente, o acúmulo de lipídeos nos vacúolos corresponde ao principal marcador, podendo ser observado e classificado de acordo com o seu tamanho em: microvesicular (pequenas vesículas lipídicas) e macrovesicular (grandes vesículas lipídicas) (WILLEBRORDS et al., 2016).

O nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença da esteatose microvesicular hepática provocada pela periodontite induzida em ratos (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017; PESSOA et al., 2017). As alterações encontradas estão relacionadas com o aumento de estresse oxidativo e peroxidação lipídica (PESSOA et al., 2017). O TNF- α durante a liberação exacerbada de citocinas na periodontite, em resposta aos produtos bacterianos (LPS) nos tecidos periodontais, pode provocar a fosforilação do receptor de insulina, levando a resistência à insulina. Por consequência, ocorre o acúmulo de ácidos graxos livres nos hepatócitos, principalmente via inibição da lipase, do GLUT-4 e da acetil- CoA sintetase (ARGUELLO et al., 2015; HAN; Sun; YANG, 2016). Quanto ao estresse oxidativo, a diminuição de antioxidantes (GSH) e formação de MDA está encontrada tanto no tecido gengival como hepático (figura 3) (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017; PESSOA, 2017).

Também foi demonstrado, previamente, que a esteatose hepática causada pela periodontite se apresentou de forma leve, o que pode ser comprovado pelo estudo de Carvalho et al. (2017), demonstrando que esse processo pode ser revertido ao remover a ligadura dos animais induzidos pela doença em apenas 20 dias. Além disso, associado a este evento, está o pericito, célula com capacidade de proliferação e diferenciação celular. No modelo de periodontite induzida por ligadura, o pericito apareceu em quantidades reduzidas, o que levou a sugerir que esta célula está envolvida no processo de regeneração do fígado na doença hepática causada pela periodontite (VASCONCELOS et al., 2017). A

partir dos relatos apresentados, uma das metas deste estudo foi caracterizar as alterações ultraestruturais na principal célula do fígado, o hepatócito, mediante a indução experimental da periodontite. O artigo publicado com esses dados se encontra no capítulo I desta tese.



Legenda: LPS-Lipopolissacarídeo, MPO-mieloperoxidase, IL- Interleucina, TNF- α - Fator denecrose tumoral alfa, GSH-glutationa, MDA- malondialdeído.

Fonte: PESSOA, 2017.

Figura 3. Esquema ilustrativo do dano remoto hepático da periodontite, evidenciando as alterações a partir da liberação das citocinas inflamatórias.

3.4 Moduladores farmacológicos das respostas do hospedeiro no tratamento da periodontite

O tratamento convencional clínico da periodontite corresponde ao uso de técnicas de alisamento e raspagem radicular com o objetivo de reduzir a carga bacteriana e inflamação local (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Além disso, são incluídos educação do paciente sobre medidas apropriadas para reduzir os biofilmes subgengivais e o controle dos fatores de risco modificáveis para a progressão da doença (SIMA; VAN DYKE, 2016). Entretanto, a

interrupção do biofilme subgengival é bem-sucedida apenas por curtos períodos de tempo, porque a maturação de novos biofilmes patogênicos é favorecida pela presença de bolsas periodontais ao redor dos dentes, que não podem ser acessados adequadamente, mesmo diante do controle higiênico (EMINGIL et al., 2004).

O uso de diferentes métodos químicos e físicos, como os antibióticos, moduladores farmacológicos das respostas do hospedeiro ou, por exemplo, a ativação por laser, podem aumentar os potenciais regenerativos e melhorar o efeito terapêutico quanto à indução antinflamatória e de resposta imune direcionada contra o patógeno (SHURSKA et al., 2014; AKRAM et al., 2016). Estes métodos, por sua vez, correspondem ao tratamento adjuvante da periodontite.

Uma diversidade de fármacos tem sido utilizada como moduladores da resposta do hospedeiro, incluindo anti-inflamatórios não esteróides (AINES), como os inibidores seletivos de COX-2 e de formação de prostaglandinas, mediadores lipídicos pró-resolutivos, bisfonatos e tetracilinas (GIANNOBILE, 2008; PRESHAW, 2008; SHURSKA et al., 2014). Contudo, a resistência bacteriana e efetividade na regeneração do periodonto ainda são fatores limitantes.

O uso de antibióticos em conjunto com a terapia mecânica ou cirúrgica é escolhido para certos casos, visando reduzir, eliminar e alterar a qualidade dos patógenos microbianos ou modificar a resposta do hospedeiro aos biofilmes subgengivais (TAIT; GREEN, 2008). A fim de ampliar o espectro da atividade, as terapias medicamentosas combinadas, como a amoxicilina e o metronidazol, podem ser consideradas vantajosas em relação às escolhas de medicamentos isolados (SIMA; VAN DYKE, 2016). Vários estudos demonstraram que, em pacientes com periodontite avançada, a administração sistêmica de metronidazol e amoxicilina resultou em melhora nas condições periodontais, eliminação / supressão de patógenos periodontais putativos e redução no tamanho das lesões inflamatórias (SHURSKA et al., 2014). No entanto, não há dados suficientes para concluir que o uso adjuvante de tais agentes pode reduzir a necessidade de cirurgia ou melhorar a retenção de dentes em longo prazo.

A modulação da resposta imune aos biofilmes subgengivais é desejada para controlar a patogenicidade, resolver a inflamação e restaurar a homeostase

tecidual, limitando a disseminação bacteriana e mantendo baixos níveis de mediadores inflamatórios que podem afetar a saúde sistêmica (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Enquanto protocolos de tratamento típicos para periodontite crônica visam à remoção de fatores etiológicos em intervalos regulares para prevenir a recorrência da doença, terapias de modulação imunológica mostram uma grande promessa à luz de evidências crescentes que demonstram vias inflamatórias alteradas na patogênese da periodontite. Como a degradação do tecido conjuntivo e a reabsorção óssea irreversível marca o início da condição da periodontite, a regulação da atividade enzimática gengival é um alvo terapêutico para a modulação imunológica na manutenção em longo prazo dos níveis de inserção dentária. Uma classe de tais drogas moduladoras do sistema imunológico tem como alvo enzimas degradadoras de tecidos que são abundantes nos tecidos periodontais como resultado de inflamação crônica não resolvida (HASTURK; KANTARCI; VAN DICKE, 2015; SIMA; VAN DYKE, 2016).

Há mais de 45 anos a clorexidina (CHX) e seus derivados (-digluconato e diacetato) têm sido utilizados com sucesso na terapia periodontal como um antiséptico, devido a uma alta potência e efeitos colaterais modestos. Entretanto, o seu uso prolongado pode levar a xerostomia, perda do paladar, dor e lesões descamativas orais que comprometem sua terapêutica (SHOLZ et al., 2017).

Em situação agravante da doença, o tratamento da periodontite necessita de intervenção cirúrgica devido à destruição do tecido periodontal ou até mesmo na remoção do dente (HASTURK; KANTARCI; VAN DICKE, 2015). Com isso, todos os caminhos que evitem essa condição devem ser tomados para garantir a qualidade e manutenção da saúde da pessoa doente.

Como descrito anteriormente, a complexidade etiopatogênica da periodontite requer uma atenção ao tratamento não só nas alterações locais, como também nas sistêmicas. Entretanto, devidas às novas descobertas em relação a essa doença causando esteatose hepática, ainda não há estudos relatando um tratamento com efeitos bidirecionais, especificamente entre os tecidos periodontais e o fígado. Por isso, um dos enfoques deste trabalho foi também analisar os parâmetros hepáticos nos animais induzidos com a periodontite e tratados com o α -TPN/ β CDs em comparação com o grupo não tratado.

3.5 Plantas Medicinais e a periodontite

Devido à alta prevalência da periodontite na população mundial e preocupante era das resistências bacterianas, compostos bioativos a partir de plantas medicinais dotados tanto da capacidade de modular a resposta inflamatória do hospedeiro quanto do controle do biofilme microbiano estão recebendo atenção considerável como novos potenciais agentes terapêuticos na prevenção e no tratamento da doença (SREENIVASAN; GAFFAR, 2009; DOYLE et al., 2015). Especialmente o Brasil, por ser um país que detém 15% a 20% da biodiversidade do mundo, com mais de 56.000 espécies, apresenta-se numa posição favorável quanto à obtenção e disponibilidade em larga escala da extração de diferentes espécies vegetais naturais e com baixo custo (BRASIL, 2016).

As plantas medicinais são ricas fontes de compostos biologicamente ativos e oferecem oportunidades de inovação na descoberta de medicamentos alternativos e seguros (SHAABAN; EL-GHORAB; SHIBAMOTO, 2012). Apesar da prática do uso dessas plantas serem milenares, muitos fármacos ainda têm sido desenvolvidos com base em produtos de origem natural ou de seus derivados, com interesse crescente principalmente em óleos essenciais derivados de plantas aromáticas (OCHENG et al., 2016).

Diversos estudos experimentais envolvendo modelos animais induzidos com a periodontite têm sido investigados a fim de conhecer a potencialidade terapêutica de extratos de plantas naturais ou moléculas purificadas (GUIMARÃES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017; WU et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018). Esse modelo traz características clínicas semelhantes ao dos seres humanos (STRUILLOU et al., 2010), possibilitando avaliar efeitos bioquímicos, anatômicos e histopatológicos de grupos de animais induzidos com e sem o tratamento proposto (HOSADURGA et al., 2015; JAYANTI et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018).

No que se refere especificamente às pesquisas envolvendo o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos, estudos têm apontado que os produtos de origem vegetal representam uma fonte promissora de inibidores da produção de citocinas, de peroxidação lipídica e da proliferação microbiana, respectivamente (LIMA et al., 2013; HATIPOĞLU et al., 2015; OCHENG et al., 2016; LIU; TSAI; PAN, 2018; RIBEIRO et al., 2018). Assim, plantas medicinais com tais atividades devem ser selecionadas para a investigação

científica relacionada ao controle do biofilme dental e de ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias voltadas para a periodontite.

3.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos odoríferos e voláteis do metabolismo secundário das plantas superiores e são encontrados em folhas, caules, sementes, flores ou outras partes das plantas aromáticas (LAH, 2004; SIENKIEWICZ; KOWALCZYK; WASIELA, 2012). São compostos, geralmente, por uma mistura complexa de monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15); embora diterpenos (C20) possam estar presentes, e uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e excepcionalmente compostos contendo N e S, cumarinas e homólogos de fenilpropanoides (SINGH; PANDEY, 2018).

As menções mais antigas sobre o uso de óleos essenciais para fins terapêuticos estão no *Papiro ebers*, onde mais de 800 remédios e tratamentos foram listados (VIGAN, 2010). O termo “óleos essenciais” surgiu porque “azeites” foram acreditados por ser “essencial” para a vida. O seu desenvolvimento, no entanto, foi retardado pelo advento dos antibióticos em meados do século XIX, sendo renovado recentemente. Estima-se que, de 3.000 óleos essenciais conhecidos, 300 foram reconhecidos como comercialmente importantes e usado principalmente no mercado de aromas e fragrâncias (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1994). Espera-se que o mercado global de óleos essenciais chegue até 2022 a 11,67 bilhões de dólares (VIGAN, 2010).

Os produtos isolados dos óleos essenciais são gerados por organismos vivos e isolados apenas por meios físicos (prensagem e decocção) de uma planta inteira ou parte da planta de origem taxonômica conhecida (MIGUEL, 2010). São geralmente considerados naturais, menos tóxicos, e, livres de resíduos, quando comparado com antibióticos (GONG et al., 2014). Dos seus constituintes, 90% são representados pelos monoterpenos, o elemento predominante dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Hidrodestilação e destilação a vapor são as técnicas convencionais mais usadas para isolar os óleos essenciais e a cromatografia líquida de alta pressão para determinar a sua composição química. Sobretudo, parâmetros como época de

colheita, órgãos da planta, maturidade da planta, diversidade genética, estado nutricional, condições ambientais, métodos de secagem e técnicas de extração e análise podem influenciar nas suas composições (SOWNDHARARAJAN et al., 2017).

Durante décadas, óleos essenciais têm sido reconhecidos por exibir atividades biológicas notáveis, incluindo atributos anti-inflamatórios (LIMA et al., 2013; PINA et al., 2018), antinociceptiva (ANJOS et al., 2017), antioxidantes (MIGUEL, 2010) e antimicrobianos (PARK et al. 2012, LIU, TSAI, PAN, 2018).

Estudos envolvendo óleos essenciais a partir de diferentes espécies de plantas têm sido desenvolvidos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* de indução da periodontite por ligadura. *Satureja hortensis* L., uma espécie de planta aromática com atividades antibacteriana e antibiofilme periodontopatógenos, foi demonstrada em modelo *in vitro* por ter a capacidade de prevenir a citotoxicidade e redução da proliferação celular após indução de tratamento pró oxidante associadas à periodontite (ZEIDA´N-CHULIÁ et al., 2013). Outros ensaios experimentais com o resveratrol e seus derivados glicosilados, um polifenol extraído de *Polygonum multiflorum* de cascas de uvas, demonstrou ser eficaz por impedir o desenvolvimento da periodontite induzida em ratos ao inibir citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-1 (CHIN et al., 2017).

Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes também foram encontrados nos ensaios clínicos de tecidos gengivais humanos com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, aplicado em concentrações de subtoxicidade. Este extrato reduziu a inflamação com participação de fibroblastos e impediu a destruição tecidual associada à periodontite (OSHENG et al., 2016).

Apesar do conhecimento sobre os possíveis benefícios terapêuticos de tantos óleos essenciais, sua implicação na prática cotidiana da odontologia ainda é escassa e pouco indicada (DAGLI; DAGLI, 2014).

3.5.2. Alfa-terpineol complexado com beta-ciclodextrina (α -TPN/ β -CDs)

Alfa-terpineol, (2-(4-Metil-1-ciclohex-3-enil)propan-2-ol) é um monoterpeneo álcool, cíclico, hidroxilado (C₁₀H₁₈O), incolor e de aroma agradável encontrado em uma grande variedade de óleos essenciais das espécies de plantas como *Eucalyptus globulus* ('Eucalipto'), *Salvia officinalis*, *Carthamus tinctorius*,

Ravensara aromatica ('Ravensara'), *Croton sonderianus* ('Marmeleiro negro') e *Melaleuca quinquenervia* ('Niaouli') (BATHIA; LETIZIA; API, 2008; HARRATI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016). A utilização deste monoterpeneo tem sido explorada tanto na indústria de perfumarias e cosméticos, como de alimentos e farmacêutica (BATHIA; LETIZIA; API, 2008).

Além de seu produto isolado, a partir dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas, o alfa-terpineol também pode ser obtido na forma sintética e biotecnológica (BICAS et al., 2010; TAI et al., 2017). Na forma biotecnológica, a síntese ocorre com fontes naturais através da biotransformação dos limoneno, α -pineno ou β -pineno utilizando microrganismos (fungos ou bactérias), geneticamente modificados, como via de transformação. De qualquer modo, a concentração do produto dependerá das condições da reação (TAI et al., 2016).

Valiosas propriedades químicas e biológicas do α -TPN tem despertado o interesse de pesquisadores, em especial por suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana ou antitumoral (NOGUEIRA et al., 2014; JING et al., 2015; DI SOTTO et al., 2014; MUSFOTA, 2014; ANJOS et al., 2017), além de outras ações, como descritas na figura 4. As vantagens do seu uso também são apontadas pelo baixo custo, disponibilidades e de valor agregado comercialmente (BATHIA; LETIZIA; API, 2008).

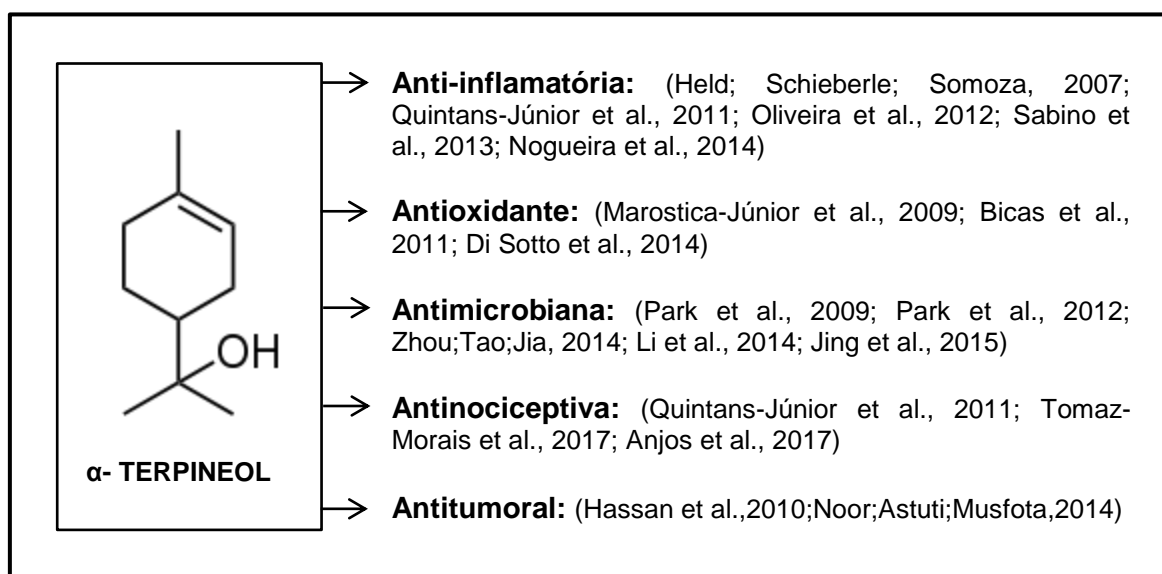


Figura 4. Esquema representativo sobre as atividades químicas e biológicas evidenciadas nos estudos com o α -terpineol.

Dentre esses estudos, PARK et al. (2012), demonstraram a ação

antimicrobiana do α -TPN frente às bactérias periodontopatogênicas e cariogênicas, utilizando células do tecido oral humano para testar se compostos com o α -TPN podem ser utilizados como candidatos para estudos pré-clínicos e clínicos. Os pesquisadores encontraram valores de concentração inibitória mínima e bactericida variando entre 0,1 a 0,8 mg.mL e quando utilizado para gargarejos e pasta dental, abaixo de 0,4 mg/mL. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar a ação deste componente isolado ou em combinação com outros compostos farmacológicos.

Após extração ou síntese, o α -TPN se apresenta altamente lipofílico, portanto insolúvel em água, o que desafia a sua administração biológica devido a sua baixa disponibilidade, solubilidade e manutenção (RODRIGUES et al., 2017). Portanto, a fim de preservar a integridade estrutural das moléculas bioativas, estruturas com o α -TPN precisam ser protegidas por uma formulação de acabamento com capacidade de entregá-las aos alvos fisiológicos sem perder qualquer bioatividade ou propriedades físico-químicas (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011; PINHO et al., 2014).

Diversos compostos naturais são apresentados como adjuvantes tecnológicos que melhoram a biodisponibilidade de fármacos, servindo de veículos de entrega, como por exemplo, os oligossacarídeos cíclicos conhecidos como ciclodextrina (CDs) (GOU; ZOU; AHN, 2011; PINHO et al., 2014).

CDs correspondem a substâncias ciclologossacarídeos advindas da degradação enzimática de amidos contendo 6, 7 ou 8 resíduos de glicose interligados por ligação glicosídica (DUCHENE; BOCHOT, 2016). Embora existam 3 tipos de classes de CDs (α -CD; β -CD e γ -CD), a isoforma β -CD é o tipos mais comumente utilizado para a encapsulação de drogas, devido a facilidade de suas obtenção e custo mais baixo (PINHO et al, 2014).

Estruturalmente, as moléculas de CDs apresentam uma porção anidrofílica externa e hidrofóbica interna (apolar), aparentando um cone truncado na qual o diâmetro da cavidade interna aumenta em função do número de unidades de glicopiranoses. Essa conformação favorece o carregamento interno de moléculas pouco solúveis em água, a exemplo do α -TPN, melhorando a solubilidade delas e, muitas vezes, a sua biodisponibilidade (figura 5) (DUCHENE; BOCHOT, 2016; RADU; PARTENI; OCHIUZ, 2016). Neste trabalho, foi usado o α -TPN complexado com a β -CD com o objetivo de avaliar sua atuação terapêutica como potencial

anti-inflamatório e antioxidante na clínica da periodontite, tanto no aspecto oral como sistêmico, como enfoque no fígado de animais induzidos com a ligadura.

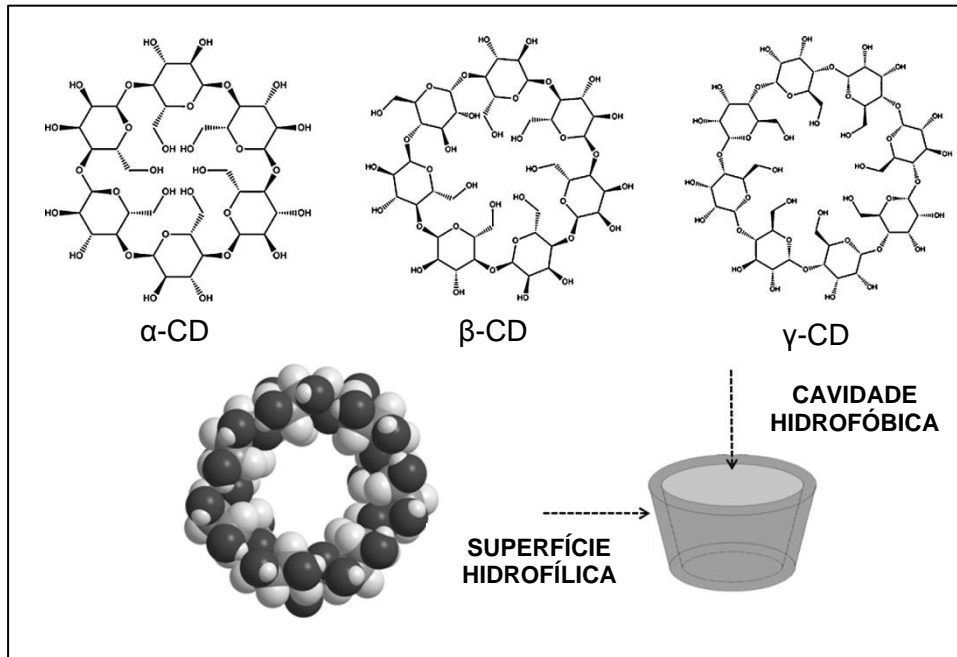


Figura 5. Esquema representativo das três classes de ciclodextrinas (α -CD; β -CD e γ -CD) e dos aspectos bioquímicos de superfície hidrofílica e cavidade hidrofóbica das CDs. Fonte: Adaptado de Pinho et al. (2014).

Alguns estudos envolvendo o α -TPN com β -CDs asseguram a eficiência deste complexo em atividades de hiperalgesia não inflamatória em roedores, aplicado ao modelo de fibromialgia, de efeito antimicrobial, antioxidante e anti-inflamatória. Em comparação com a substância livre (isolada) do α -TPN, os pesquisadores encontraram resultados mais duradouros com o complexo α -TPN com β -CDs (OLIVEIRA et al., 2016; ANDRADE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

3.6 Modelo animal da periodontite

O modelo de indução da periodontite usando ligadura em animais é bem estabelecido e há muitos anos vem contribuindo com novos conhecimentos nas ciências biológicas e para o teste de novas abordagens terapêuticas voltadas ao tratamento da doença (OZ; PULEO, 2011). Para que ocorra a indução, uma ligadura (de nylon, seda ou fio de algodão) retentora de placa bacteriana é

colocada ao redor dos primeiros molares inferiores do animal (ratos, cães ou camundongos) para facilitar o desenvolvimento de acúmulo de biofilme oral, provocando um dano ao tecido gengival e periodontal como uma ulceração do epitélio do sulco. O biofilme aderido ao fio facilita a invasão de microrganismos para o tecido conjuntivo, levando a alterações no tecido periodontal similares às observadas em periodontites humanas com infiltrados inflamatórios e consequente perda de inserção do LP e de osso alveolar (figura 6) (MARCHESAN et al., 2018).



Figura 6. Imagem representativa do modelo de indução experimental da periodontite em ratos utilizando fio de nylon ao redor do primeiro molar inferior. Fonte: Próprio autor.

Há diversas vantagens para o uso do modelo de indução com ligadura em comparação com outros modelos que incluem a facilidade e rapidez da técnica, perda óssea previsível e capacidade de estudar a regeneração óssea do tecido periodontal e alveolar (OZ; OULEO, 2011). Além disso, os estudos vêm utilizando ratos para a aplicação do modelo, tendo em vista a facilidade de manipulação, o baixo custo, capacidade de manutenção em condição livre de germes e a possibilidade de desenvolvimento de imunodeficiências (MARCHESAN et al., 2018).

Neste trabalho foi realizada a indução da periodontite em ratos *Wistar* por procedimento cirúrgico com prévia anestesia, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal (CEEA) (ANEXO D).

CAPÍTULO I

Periodontite causa alterações no fígado de ratos

Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos^{1,2}, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos², Felipe Rodolfo Pereira da Silva², Luiz Felipe de Carvalho França², Even Herlany Pereira Alves², David Di Lenardo², Larissa dos Santos Pessoa², Pedro Duarte Novaes³, André Luiz dos Reis Barbosa⁴, Arya Mani⁶, Flávia Sammartino Mariano⁵, Jand-Venes Rolim Medeiros⁵, Aldeídia Pereira de Oliveira¹

1 Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais (NPPM), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

2 Faculdade de Medicina, Instituto de Ensino Superior do Vale do Parnaíba, Parnaíba, Piauí, Brasil.

3 Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHis), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil.

4 Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Morfologia, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

5 Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFFEX), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil.

6 Centro de Pesquisa Cardiovascular, Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Yale, New Haven, EUA.

* Autor correspondente: Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Ministro Reis Veloso, Colegiado de Biomedicina, Av. São Sebastião, 2819, Reis Veloso, Parnaíba - PI – Brasil, 64204-035. Phone: +55 86 3323 5248; Fax: +55 86 3323 5444, E-mail: vasconcelos@ufpi.edu.br

Título curto: Periodontite causa danos no fígado

Resumo

A periodontite causa danos não apenas no periodonto, como também em outros tecidos como: articular, renal, cardíaco e hepático. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi investigar as alterações causadas pela periodontite na função e estrutura hepática, usando um modelo experimental em ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Vinte ratos, fêmeas, (*Rattus norvegicus*) foram separados aleatoriamente em dois grupos: controle e periodontite (n=10, cada grupo). O índice de sangramento gengival (ISG), mobilidade dentária (MD), profundidade de sondagem (PS), altura óssea alveolar (AOA) estresse oxidativo e biomarcadores sanguíneos foram avaliados. Reações de imunohistoquímica foram realizadas para fosfatase alcalina (FAL) no fígado. Foram avaliadas ainda as quantidades de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e lipídeos hepáticos. Por fim, os fígados das ratas foram avaliados com microscópio de luz convencional e microscópio eletrônico de transmissão (MET). **RESULTADOS:** avaliação histopatológica mostrou grau de esteatose, hepatócitos binucleados e células positivas para FAL em maiores quantidades no grupo com periodontite, em comparação com o grupo controle. A avaliação com MET revelou aumento significativo no tamanho e número de vesículas lipídicas (VL), maior espaçamento entre as cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias aumentadas, foamy citoplasmático e maior acúmulo de glicogênio no tecido hepático das ratas com periodontite, quando comparados com o grupo controle. Além disso, os níveis plasmáticos de FAL, lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos e colesterol total estavam alterados. **CONCLUSÃO:** A periodontite experimental causou alterações imunohistoquímicas para FAL, histopatológicas, ultraestruturais, de estresse oxidativo e bioquímicas no fígado das ratas.

Palavras-chave: doença periodontal; fígado; medicina oral; citocinas; inflamação.

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória, que afeta quase 50% dos adultos e é um importante problema no mundo, dentre as doenças orais (PETERSEN et al., 2005; EKE et al., 2015). A destruição causada pela periodontite resulta do desequilíbrio na resposta do indivíduo provocado por bactérias, periodontopatógenos e outros metabólicos, que estimulam uma produção excessiva de mediadores inflamatórios. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) liberadas por células de defesa em resposta à bactérias, periodontopatógenos, metabólicos e lipopolissacarídeos (LPS) contribuem para a destruição periodontal (CHAPPLE, 1997; WHITE et al., 2016).

A periodontite causa danos não apenas nos tecidos periodontais, mas também em outros tecidos, como: articular (LIN et al., 2017), renal (FRANÇA et al., 2017), cardíaco (KOSE et al., 2017) e hepático (TOMOFUJI et al., 2007; YONEDA et al., 2012; CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada por acúmulo de gordura em mais de 5% dos hepatócitos na ausência de ingestão excessiva de álcool (ABD EL-KADER; EL-DEN ASHMAWY, 2015). A DHGNA é estimada em afetar 30% da população mundial (BEDOGNI et al., 2005). Alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos são características da DHGNA (WALTHER; FARESE, 2009). O estresse oxidativo é um elemento importante e associado ao mecanismo fisiopatológico das condições inflamatórias que ocorrem na DHGNA (MIKOLASEVIC et al., 2016). Além disso, aumentos de citocinas como: interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) podem acelerar o acúmulo de gordura no fígado (TILG; DIEHL, 2000; MIKOLASEVIC et al., 2016).

Além disso, a microbiota intestinal tem aparecido como uma emergente causa de DHGNA (LAU; CARVALHO; FREITAS, 2015). Neste sentido, alguns estudos demonstraram que bactérias associadas com a periodontite como: *Porphyromonas gingivalis* (YONEDA et al., 2012) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (KOMAZAKI et al., 2017) podem influenciar o desenvolvimento e progressão da DHGNA. Estas e outras bactérias associadas com a periodontite apresentam LPS em suas paredes celulares, o qual pode ser degradado pela fosfatase alcalina (FAL), uma superfamília de metaloenzimas, através da remoção do fosfato-A do LPS (POELSTRA et al., 1997). Este processo catalítico reduz a afinidade pelo receptor

Toll-like (KIM et al., 2007). Em adição, a FAL pode regular a absorção de lipoproteínas e atuar como um marcador para doenças no fígado (LYNES et al., 2011; POUPON, 2015).

Diversas ferramentas de diagnóstico clínico para DHGNA têm sido desenvolvidos, incluindo biomarcadores, técnicas de imagem, mas o padrão ouro para diagnóstico ainda é a avaliação histopatológica (TAKAHASHI; FUKUSATO, 2010). Ao lado disso, o acúmulo de gordura no hepatócito, pode provocar a presença de mais de um núcleo por célula, característica, que pode estar associada com a divisão celular. Foi demonstrado que o estresse oxidativo pode causar falha na citocinese, levando a uma divisão celular incompleta e binucleação do hepatócito (TORMOS-ANA et al., 2014). O estresse oxidativo também está associado com alterações ultraestruturais nos hepatócitos nas doenças hepáticas (AHISHALI et al., 2010).

Nós demonstramos previamente que a periodontite induzida com ligadura causou esteatose microvesicular e tal processo pode ser revertido após a remoção da ligadura do dente dos animais (CARVALHO et al., 2017). Outro estudo de nosso grupo de pesquisa revelou que os pericitos estavam associados com alterações no tecido hepático (VASCONCELOS et al., 2017). Embora tal associação entre periodontite e DHGNA tenha sido proposta (TOMOFUJI et al., 2007; YONEDA et al., 2012; SAITO et al., 2015; CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017; AKINKUGBE et al., 2017), muitos pontos ainda permanecem obscuros.

Nenhum estudo avaliou pela reação de imunohistoquímica a FAL, nem citocinas (TNF- α e IL-1 β), como também a quantidade de hepatócitos binucleados e os componentes ultraestruturais no fígado com MET. Além disso, nós avaliamos o estresse oxidativo, os níveis de lipídeos e marcadores sanguíneos. E para estudar esses parâmetros, o modelo de periodontite induzida com ligadura foi usado neste estudo.

Material e métodos

Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o protocolo 384/17. Foram mantidas 20 ratas (222,4 \pm 4,8g), Wistar, em temperatura de 23 a 25 $^{\circ}$ C, com ciclos de claro e

escuro de 12 horas, onde receberam água e ração *ad libitum*, passando antes por um período de aclimatação, antes dos experimentos.

Desenho do estudo

As ratas foram separadas aleatoriamente em dois grupos, com 10 animais por grupo: 1) Controle, ratas que não receberam ligaduras (indução da periodontite); 2) Periodontite, ratas que receberam ligaduras para induzir a periodontite;

A indução da periodontite foi realizada com anestesia prévia e administração prévia de solução intramuscularmente de 2% hipoclorito de xylazina, (Rompum-Bayer®, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 15 mg/Kg e quetamina, (Francotar-Virbac®, Roseira, SP, Brazil) na dose de 40 mg/Kg. Posteriormente, um fio de nylon 3-0 (Shalon®, Goiania, GO, Brasil) foi inserido na região do sulco gengival ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente (VASCONCELOS et al., 2017; PESSOA et al., 2018). Após 20 dias, as ratas foram eutanasiadas e o sangue coletado para os testes bioquímicos. Os fígados, massas corporais foram medidos.

Índice de sangramento gengival (ISG) e avaliação da mieloperoxidase (MPO)

O escore para avaliação do ISG foi realizado de acordo com Liu et al. (2012) em classificado em: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 para os primeiros molares inferiores bilateralmente (PESSOA et al., 2018). Para a avaliação da MPO gengival, seguiu-se a metodologia de Chaves et al. (2013).

Mobilidade dentária (MD) dos 1^{os} molares inferiores e profundidade de sondagem (PS)

A MD foi classificada nos seguintes escores: 0, mobilidade fisiológica; 1, mobilidade leve, movimentação do dente no sentido vestibulo-palatina; 2, mobilidade moderada, movimentação vestibulo-palatina e méso-distal; 3, mobilidade severa (movimentação vestibulo-palatina, méso-distal e vertical no sentido alvéolo dentário) (Xu & Wei, 2006). A PS foi avaliada com uma sonda milimetrada especial, com raio de 0,2 mm, de acordo com Liu et al. (2012).

Altura óssea alveolar (AOA)

A AOA foi realizada conforme Vasconcelos et al. (2017) e as imagens capturadas e medidas com o software ImageJ v.1.48.

Avaliação histopatológica do fígado

Os fígados das ratas foram coletados do lobo esquerdo e processados como de rotina histológica, segundo Vasconcelos et al. (2017). Os escores para esteatose foram classificados de acordo com a porcentagem de hepatócitos com gordura acumulada em seu citoplasma, em: 0, nenhum; 1, <5%; 2, 6%-33%; 3, 34%-66%; 4, >66%. Os escores para inflamação e necrose foram classificados em: 0: nenhum; 1: <2 focos por campo; 2: 2-4 focos por campo; 3:> 4 focos por campo. Para a contagem de hepatócitos binucleados, foi avaliada uma área de 45.000 μm^2 do tecido hepático com microscópio de luz (NOVA®, Piracicaba, SP, Brazil). A avaliação no número de mastócitos, foi realizada de acordo com Franceschini et al. (2017).

Imunohistoquímica para fosfatase alcalina (FAL)

Os fígados foram marcados para FAL e uma área de 45.000 μm^2 do tecido hepático foi avaliada. Após preparação de rotina histológica, a parafina foi removida e a peroxidase foi bloqueada com 5% de H_2O_2 em água. Após o bloqueio da reatividade inespecífica com albumina bovina (3%) em tampão fosfato, o anticorpo primário (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi usado 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foi aplicado nos corte, overnight na temperatura de 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados com tampão fosfato e incubados com o anticorpo secundário (LSAB2 system, DAKO, Glostrup, Denmark), por 40 min a 37,5°C. A solução de diaminobenzidine (3,3 diaminobenzidino) foi usada e a hematoxilina como contra corante.

Avaliação dos hepatócitos com microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Pequenos fragmentos hepáticos com 1 mm^3 do lobo lateral e medial foram processados conforme López-Navarro et al. (1996). Os ultra-cortes foram visualizados e capturados usando um MET (JEM 1400, JEOL, Japan) a 80 kV. As imagens digitais foram capturadas com um sistema digital (Gatan, Pleasanton, CA, EUA). Para avaliação das vesículas lipídicas (VL), foram mensuradas as imagens dos grupos em um aumento de 6.000x, que continham ao menos um hepatócitos nucleado, de acordo com Watanabe et al. (1988). Além disso, a distância entre as cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER), o tamanho das mitocôndrias foram mensurados com uma ampliação de 15.000x. O *foamy* citoplasmático foi

avaliado usando uma malha com 100 pontos em uma área de $1.170 \mu\text{m}^2$ com um aumento de 8.000x. O armazenamento de glicogênio foi classificado em escores: 0, armazenamento fisiológico; 1, leve acúmulo de glicogênio; 2, acúmulo moderado de glicogênio; 3, acúmulo severo de glicogênio. Todas as ultraestruturas examinadas basearam-se em Ghadially (1988) e utilizaram o *software* ImageJ v.1.48.

Ensaio de imunoabsorção enzimática - enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Para a avaliação da concentração de NO_3/NO_2 , o homogenato de fígado foi incubado numa microplaca com nitrato redutase por 12 horas para converter NO_3 NO_2 . A produção do óxido nítrico foi determinada pela mensuração das concentrações de nitrito em placas de ELISA lidas em 540nm (Green et al., 1982).

Em relação às dosagens das citocinas IL-1 β e TNF- α , amostras do fígado foram coletadas e homogenadas em soro fisiológico estéril. Após isso, os níveis de IL-1 β e TNF- α foram avaliados usando kits de ELISA, Segundo recomendação do fabricante. Os homogenatos foram centrifugados a 0,8g na temperatura de 4°C por 11min e os sobrenadantes foram armazenados em -70°C até o momento das análises.

Para os marcadores sanguíneos, níveis de FAL, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), glicose, total colesterol, lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos foram mensurados. Para a avaliação da concentração de colesterol e triglicerídeos hepáticos foi seguido o método de Folch Less and Sloane Stanley (1957) e para tais análises, tanto para o sangue como para o fígado, kits comerciais foram usados (Labtest®, Belo Horizonte, MG, Brazil).

Níveis de glutaiona (GSH), malondialdeído (MDA) e glicose

Para se avaliar os efeitos sistêmicos da periodontite sobre o estresse oxidativo hepático, mensurou-se os níveis de GSH, segundo Sedlak et al. (1968).

Para se avaliar os efeitos sistêmicos da periodontite sobre a peroxidação lipídica hepática, mensurou-se os níveis de MDA, segundo Mihara et al. (1978).

E para avaliação da glicemia aleatória, foi utilizado um glicosímetro (Accu-Chek Active, São Paulo, SP, Brasil), previamente a eutanásia das ratas.

Estatística

Os resultados foram expressos como média e moda (erro padrão e/ou valores mínimos e máximos). O teste de *Kolmogorov-smirnov* foi usado para verificar se os dados apresentaram distribuição normal. A diferença entre os grupos foi avaliada com teste T não pareado para dados com distribuição normal e para dados com distribuição fora da normalidade, foi usado o teste de Mann-Whitney, com * $p < 0,05$.

Resultados

ISG, MD e níveis de MDA e MPO

As ratas com periodontite, grupo periodontite, apresentaram alteração de cor, edema, sangramento gengival, quando comparado com o grupo controle, sem a indução da periodontite (Figura 1A e 1B; grupos controle e periodontite, respectivamente). ISG (Figura 1C), MD (Figura 1D), MDA (Figura 1E) e os níveis de MPO (Figura 1F) foram significativamente maiores do que nas ratas sem periodontite, como observado na figura 1.

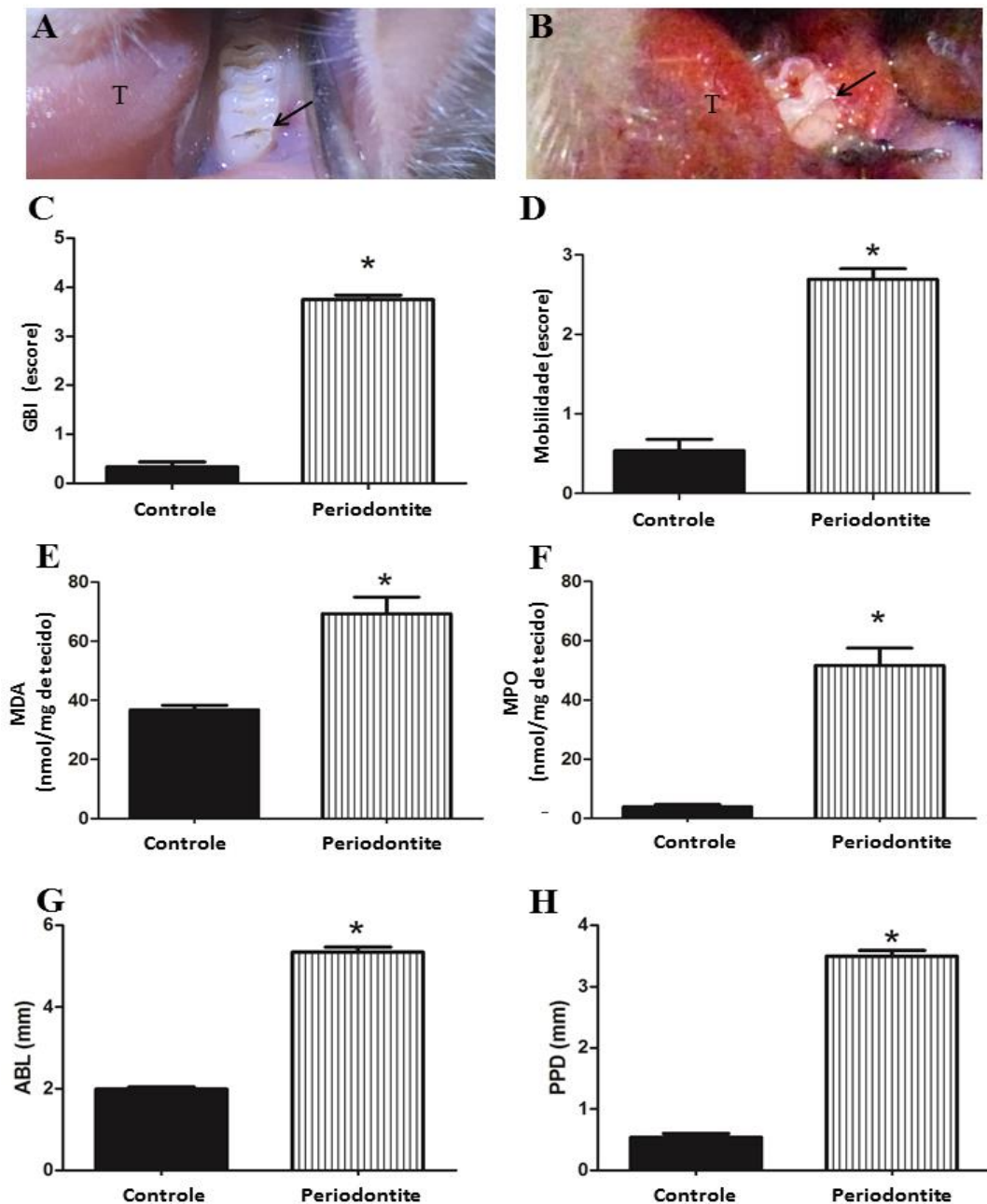
Avaliação da AOA e PS

O grupo periodontite apresentou significativo aumento dos valores AOA (Figura 1G) e PS (Figura 1H). Os resultados de ISG, MD, MDA, AOA e PS mostraram que a indução da periodontite ocorreu normalmente, provocando a doença, permitindo que as possíveis avaliações sistêmicas fossem avaliadas.

Massa corporal e hepática e marcadores no sangue e no fígado

As massas corporais e hepáticas não diferiram estatisticamente entre os grupos, como visto na tabela 1.

FAL, HDL, triglicerídeos e colesterol total apresentaram-se significativamente alterados no grupo periodontite, em comparação com o grupo controle (Tabela 1). Os níveis sanguíneos de GGT, ALT, AST e glicose apresentaram-se mais elevados no grupo periodontite do que no grupo controle ($p > 0,05$). Além disso, os níveis sanguíneos e hepáticos de colesterol e triglicerídeos foram significativamente maiores no grupo periodontite, comparado com o grupo controle (Tabela 1).



A) apresenta o aspecto clínico normal do grupo controle, a língua está representada em T (*tongue*) e o 1º molar na seta. B) Aspecto clínico do grupo periodontite, apresentando gengiva com alteração de cor, severo edema e sangramento gengival após sondagem periodontal. C) Escore para o índice de sangramento gengival (ISG). D) Mobilidade dentária (MD) dos primeiros molares inferiores. E) Níveis de MDA. F) Mieloperoxidase (MPO). G) Altura óssea alveolar (AOA). H) Profundidade de sondagem (PS). O escore para ISG, os níveis de MDA e GSH junto com AOA e PS apresentaram significativamente alterados no grupo periodontite, em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$.

Figura 1. Parâmetros orais (índice de sangramento gengival, mobilidade dentária e níveis de MDA e MPO gengivais) e avaliação da altura óssea alveolar e profundidade de sondagem.

Níveis de NO₃/NO₂, MDA, GSH, MPO, IL-1 β e TNF- α no fígado

Os níveis de NO₃/NO₂, MDA e MPO estão apresentados na tabela 1, com valores maiores para o grupo periodontite, comparado com o grupo controle. Os valores para GSH também apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 1). Para IL-1 β e TNF- α no fígado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

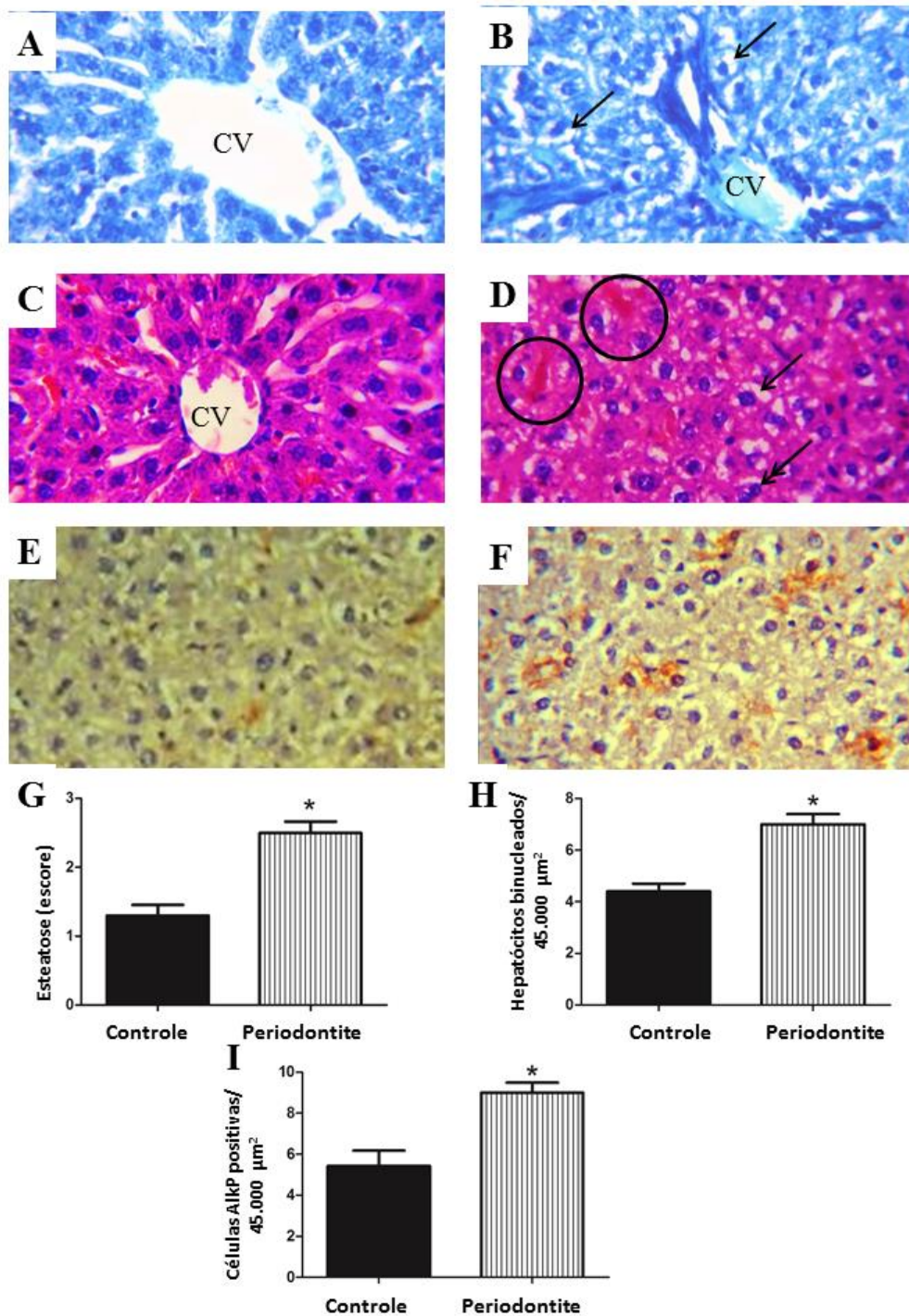
Avaliação imunohistoquímica e histopatológica do fígado

O grupo controle apresentou estrutura hepática normal (Figuras 2A e 2C). Por outro lado, amostras dos fígados do grupo periodontite apresentaram alterações histopatológicas, como: hepatócitos com esteatose microvesicular, perda da organização dos cordões de hepatócitos ao redor da veia central e congestão venosa (Figuras 2B e 2D). A quantidade de células positivas para FAL foi significativamente maior no grupo periodontite, em comparação com o grupo controle (Figuras 2E, F e I). Além disso, o grupo periodontite apresentou maior ($p < 0,05$) grau de esteatose hepática (escore) (Figura 2H), quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o escore de inflamação, necrose e contagem para mastócitos (inflamação, 1 (1-2) para o grupo controle, 1 (1-2) para o grupo periodontite; necrose, 1 (1-1) para o grupo controle, 1 (1-1) para o grupo periodontite; contagem de mastócitos, $1,7 \pm 0,5$ para o grupo controle, $1,8 \pm 0,5$ para o grupo periodontite; $p > 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros de massa e marcadores sanguíneos e hepáticos.

Grupos	Controle	Periodontite
Parâmetros de massa		
Corporal (g)	218,4 ± 5,0	226,5 ± 4,6
Fígado		
Relativo (%)	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Absoluto (g)	7,1 ± 0,3	7,0 ± 0,4
Marcadores sanguíneos		
FAL (U/dL)	46,1 ± 6,9	67,9 ± 5,7*
AST (U/dL)	67,2 ± 2,3	87,6 ± 6,1
ALT (U/dL)	28,5 ± 2,5	34,9 ± 1,7
GGT (U/dL)	10,1 ± 2,5	15,4 ± 3,8
Glicose [#] (mg/dL)	268,1 ± 14,5	259,6 ± 18,6
Colesterol total (mg/dL)	62,4 ± 2,2	80,3 ± 4,9*
HDL (mg/dL)	77,4 ± 3,0	38,2 ± 1,4*
Triglicerídeos (mg/dL)	58,1 ± 3,8	84,7 ± 3,6*
Marcadores hepáticos		
Colesterol total (mg/dL)	2,4 ± 0,4	5,2 ± 1,0*
Triglicerídeos (mg/dL)	97,2 ± 5,0	134,3 ± 11,8*
IL-1 β (pg/mg)	307,5 ± 7,6	302,7 ± 13,1
TNF- α (pg/mg)	239,4 ± 4,1	247,4 ± 3,7
NO ₃ /NO ₂ (mM)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0*
MDA (mmol/g of the tissue)	84,0 ± 3,7	122,0 ± 9,7*
GSH (μ mol/g of the tissue)	461,7 ± 37,9	150,0 ± 45,3*
MPO (mmol/g of the tissue)	3,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3

*p < 0,05 comparando o grupo periodontite com o grupo controle (Teste T não pareado). Resultados expressos em media e erro padrão (\pm). # glicose aleatória, sem jejum.



Fígado em A) e C) demonstrando hepatócitos com organização normal ao redor da veia central (CV – central vein) no grupo controle. O grupo periodontite apresenta gordura hepática ilustrada em B) e D) com congestão venosa (círculo) e hepatócitos binucleados (seta dupla) são observados. O grupo periodontite apresentou valores maiores para G) escore de esteatose, H) número de hepatócitos binucleados e I) células positivas para FAL, comprando-se com o grupo controle. E) ilustra células positivas para FAL no grupo controle e F) no grupo periodontite. A) e B) azul de toluidina, C) e D) hematoxilina e eosina, E) e F) imunohistoquímica para FAL, todas as fotomicrografias estão no aumento original de 600x. * $p < 0,05$.

Figura 2. Imagens histopatológicas do fígado e análise Imunohistoquímica para FAL.

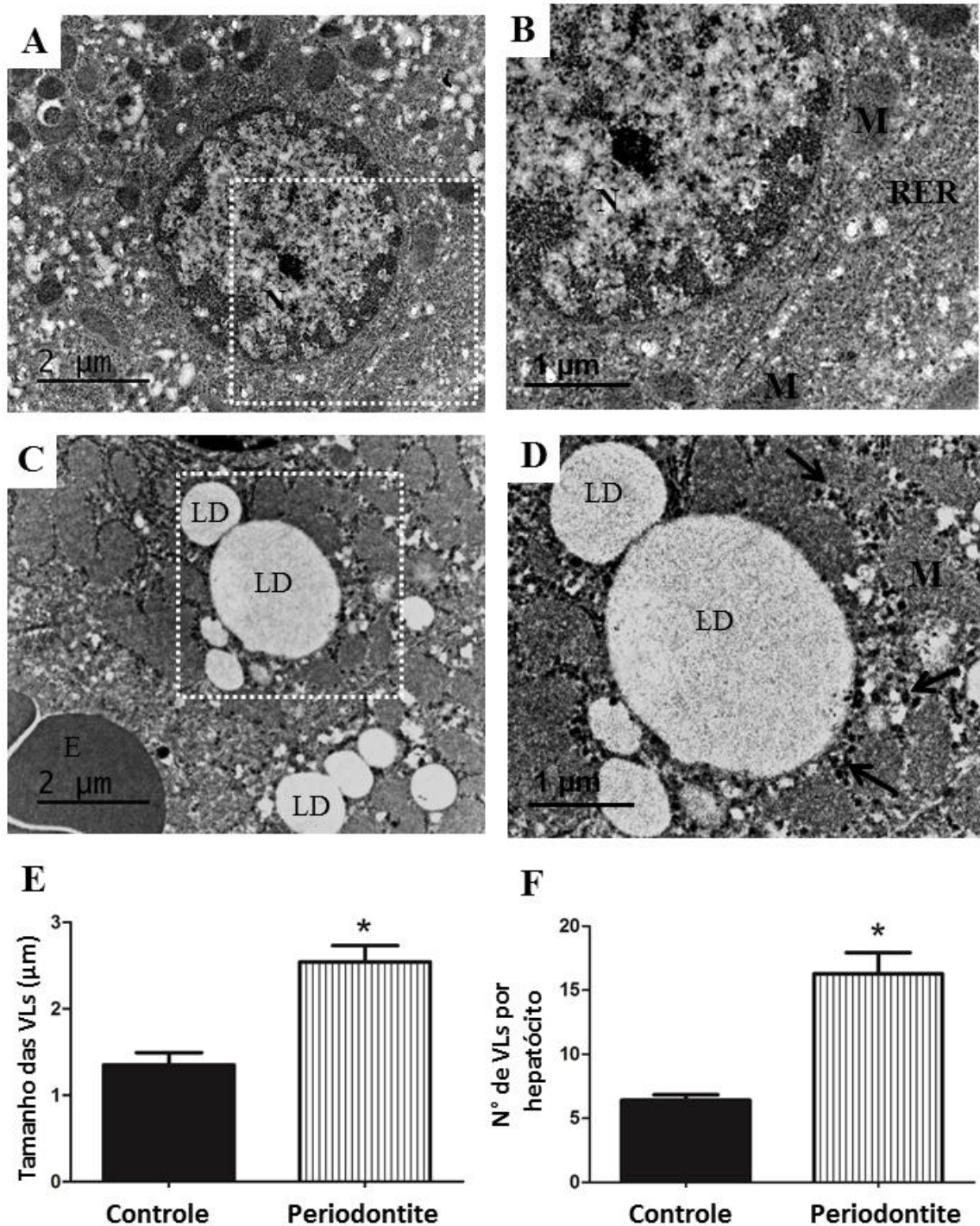
Avaliação dos hepatócitos com microscópio eletrônico de transmissão (MET)

O grupo periodontite apresentou um aumento significativo no tamanho e número das VL por hepatócitos, comparando-se com o grupo controle (Figura 3). Ao se avaliar o RER, o grupo controle apresentou cisternas normais (figura 4A), enquanto o grupo periodontite apresentou uma dilatação das cisternas do RER, da ordem de 75,8%, como observado na figura 4B e C.

As mitocôndrias mostraram ultraestrutura normal nas ratas do grupo controle (figura 4A). Diferentemente do grupo periodontite, que as mitocôndrias apresentaram menos elétrons densas e com cristas mitocôndriais menos distinguíveis (Figura 4B). Quanto à avaliação ultraestrutural do retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos, o grupo controle apresentou normalidade em sua ultraestrutura (Figura 5A e B). Por outro lado, no citoplasma dos hepatócitos do grupo periodontite, houve abundante *foamy* citoplasmático (Figura 5C e D). O *foamy* citoplasmático é o resultado da proliferação do REL e acúmulo do glicogênio (Figura 3D), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 5E, demonstra o *foamy* citoplasmático e figura 5F, o acúmulo de glicogênio).

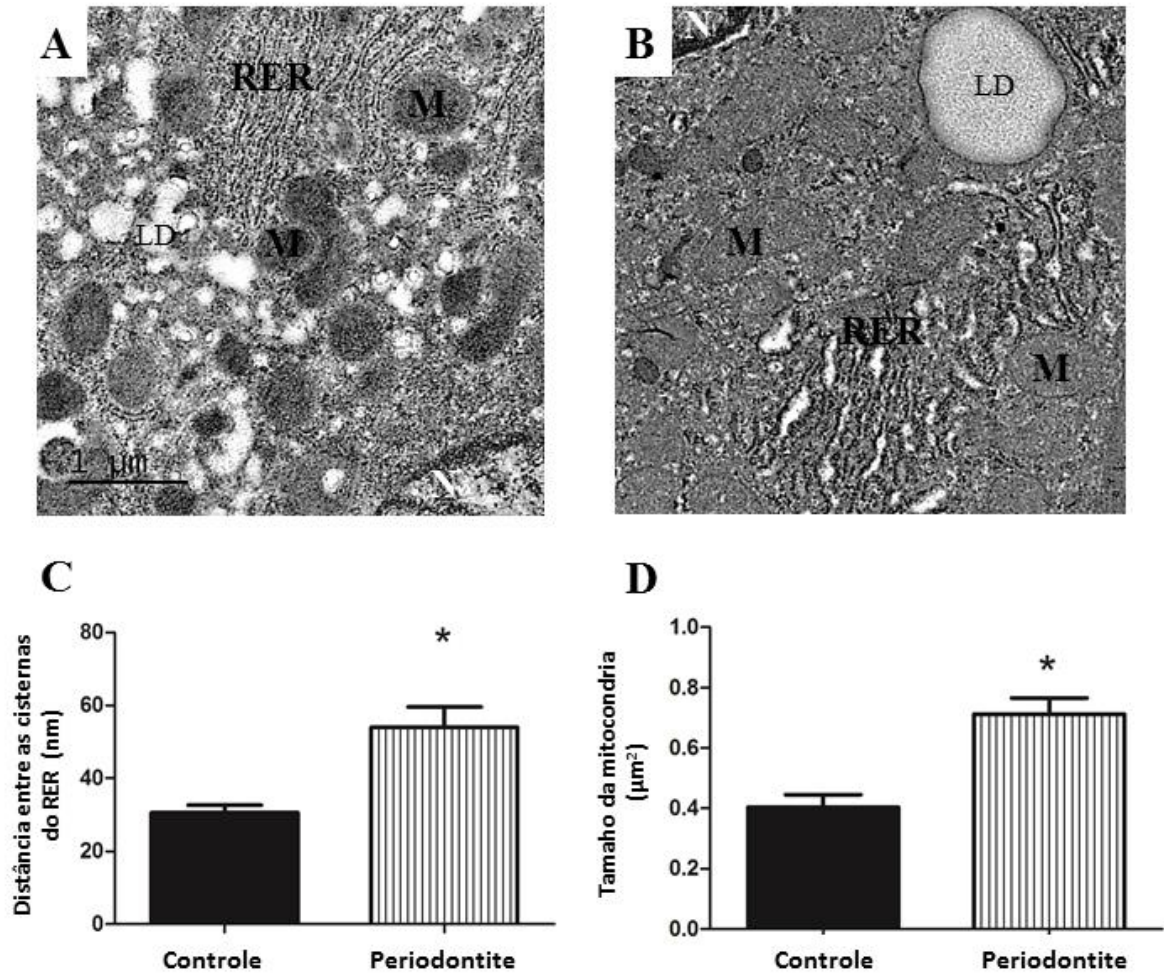
Discussão

Este estudo foi desenhado para esclarecer a associação entre a periodontite e as anormalidades hepáticas. Assim, foram demonstradas significantes mudanças nos fígados dos animais com periodontite induzida com ligadura. Este é o primeiro estudo na literatura mostrando o desenvolvimento de alterações histopatológicas no fígado, com destaque no aumento no número de hepatócitos binucleados e positivos para FAL nas ratas com periodontite, comparando-se com as ratas do grupo controle. Além disso, os resultados demonstraram significativo aumento no tamanho e número das VL, na distância entre as cisternas do RER, tamanho das mitocôndrias, *foamy* citoplasmático e acúmulo de glicogênio, como também: nos níveis de NO_3/NO_2 nos fígados dos animais do grupo periodontite *versus* grupo controle. Da mesma forma, os níveis de FAL sanguíneos também se apresentaram elevados no grupo periodontite ($p < 0,05$).



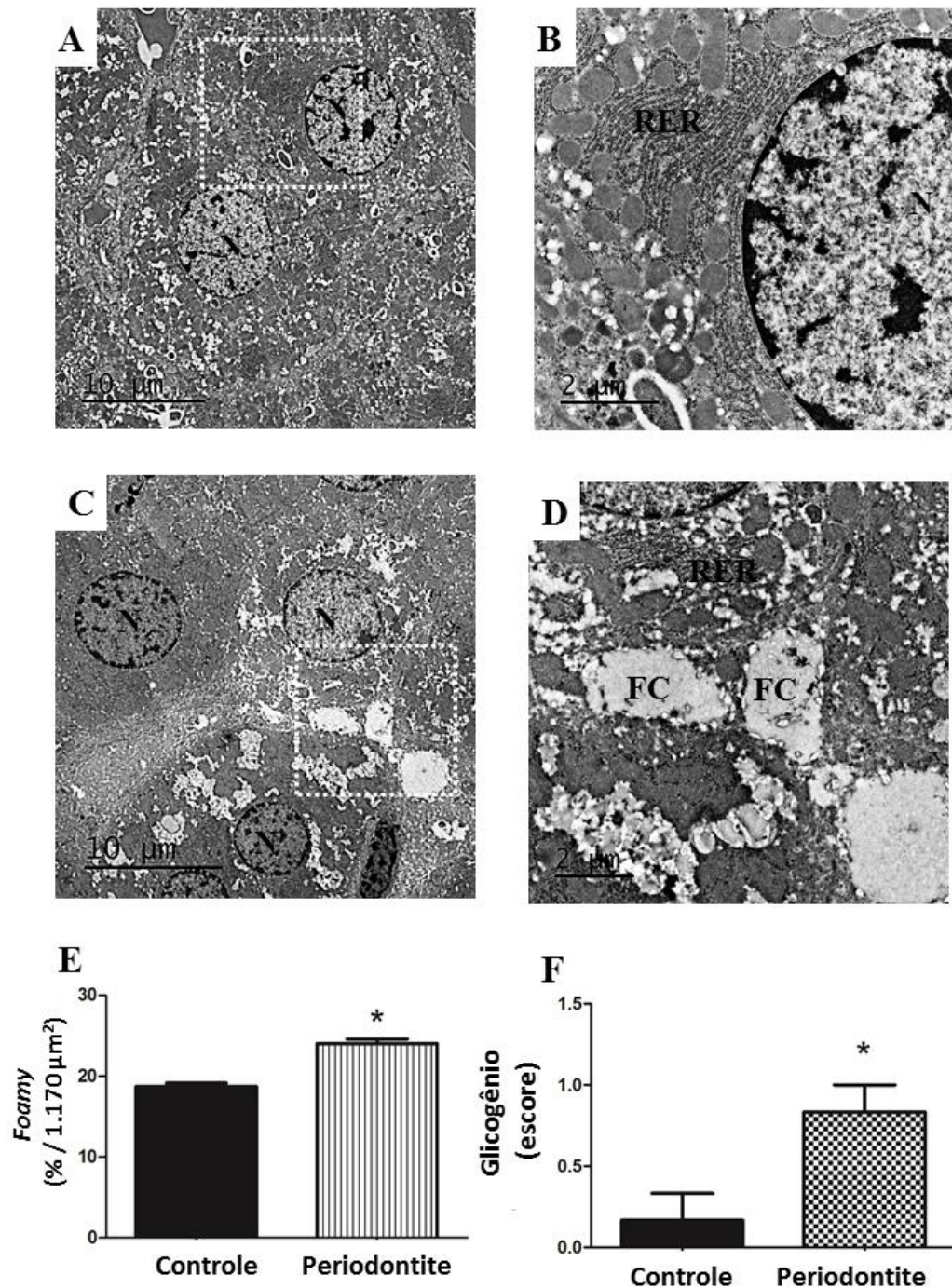
A) hepatócito com ultraestrutura normal do grupo controle, mostrado no retângulo branco B) área em maior aumento, demonstrando aspecto normal da mitocôndria (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) e núcleo (N). Diferentemente, c) o grupo periodontite mostra hepatócito com aumento no tamanho e número de VLs (Vesículas lipídicas, do inglês - LD – lipid droplets), D) área em maior aumento, representando detalhe das VLs (LD) e acúmulo de glicogênio (Setas). Valores elevados para E) tamanho e F) número das VLs (LD) foram observados no grupo periodontite, comparando-se com o grupo controle. E, eritrócito; M, mitocôndria; N, núcleo. Imagens A) e C) do microscópio eletrônico de transmissão (MET) em aumento original de 10.000x, e B) e D) aumento original de 15.000x. *p<0,05.

Figura 3. Avaliação ultraestrutural dos hepatócitos por MET.



A) Hepatócitos com mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) normais são observados no grupo controle. B) Ilustra hepatócito com dilatação do RER e mitocôndrias maiores, com cristas mitocondriais menos elétrons densas e menos distinguíveis no grupo periodontite. C) Dilatação das cisternas do RER e D) mitocôndrias maiores no grupo periodontite, quando comparadas com as mitocôndrias do grupo controle. LD, lipid droplets – (vesículas lipídicas); N, núcleo. Imagens do MET com aumento original de 15.000x. * $p < 0,05$.

Figura 4. Avaliação ultraestrutural dos RER e mitocôndrias dos hepatócitos por MET.



Dois hepatócitos normais são observados no centro da imagem de animais do grupo controle, B) o retângulo branco mostra a área demarca pelo retângulo em maior aumento, demonstrando retículo endoplasmático rugoso (RER) normal, núcleo (N). C) Apresentam hepatócitos com abundante *foamy* citoplasmático (FC) no grupo periodontite. D) Apresenta a área do retângulo branco em maior aumento, representando os detalhes do FC nos hepatócitos dos ratos com periodontite. A periodontite causou aumento de E) FC e F) no acúmulo de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos com periodontite, comparando-se com o grupo controle. N, núcleo. Imagens A) e C) com aumentos originais de 2.500x, e B) e D) com aumentos originais de 8.000x. * $p < 0,05$.

Figura 5. Avaliação ultraestrutural por MET do retículo endoplasmático liso e citoplasma dos hepatócitos.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente esteatose microvesicular em ratos com periodontite (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017), mas o aumento no número de hepatócitos binucleados no fígado de animais com periodontite ainda não tinha sido relatado. O hepatócito binucleado demonstra uma tentativa da célula se regenerar de danos provocados (ELKHATEEB et al., 2015). Uma estratégia deste estudo foi usar ratas fêmeas, que apresentam maior número de hepatócitos binucleados, resultado do dimorfismo sexual da espécie (MARCOS et al., 2016). Esta estratégia aumentou o sucesso de nossa investigação e testar a reprodutibilidade destes achados com ratos machos pode ser interessante.

Em relação à avaliação dos escores de esteatose ($p < 0,05$), inflamação ($p > 0,05$) e necrose ($p > 0,05$), os escores apresentaram-se maiores no grupo periodontite, quando comparado com grupo controle, corroborando com estudos prévios (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017). Não foi encontrado esteatose macrovesicular, nem fibrose hepática. Os dados de MPO junto com as dosagens das citocinas (IL-1 β and TNF- α) não demonstraram diferença entre os grupos, indicando que a esteatose causada pela periodontite foi leve em comparação com esteatohepatite, na qual o processo inflamatório agudo, com elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (TILG; DIEHL, 2000; HANDA et al., 2017).

Previamente foi demonstrado por nós, que a esteatose microvesicular está associada com níveis diminuídos de GSH e aumentados de MDA causados pela periodontite (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017). Neste estudo, pela primeira vez na literatura foi demonstrado que a periodontite também causou aumento nos níveis de NO₃/NO₂ no fígado dos animais com periodontite, comparando-se com os animais sem periodontite. Estes elevados níveis agrupam achados do nosso estudo. Um estudo demonstrou que hepatócitos não completaram a divisão celular em condições de estresse oxidativo, apresentando falha na citocinese e binucleação (TORMOS-ANA et al., 2014), como observado em nosso estudo. Nós acreditamos que o aumento no número de hepatócitos binucleados significa uma proliferação compensatória associada a injúria hepática causada pela periodontite.

Este estudo é o primeiro na literatura a descrever alterações ultraestruturais no fígado de animais com periodontite. Foi possível observar a principal característica da esteatose, que é o acúmulo de gordura nos hepatócitos. O

aumento nos níveis de estresse oxidativo causou liberação excessiva de produtos da peroxidação lipídica (HENKEL et al., 2012), como também demonstrado por estes dados com elevados níveis de MDA hepáticos nas ratas com periodontite. Além disso, os dados de colesterol e triglicerídeos no sangue como também no fígado (Tabela 1) suportam este achado. Para avaliar a ultraestrutura das VL nos hepatócitos, foi usado o MET, o qual permitiu contar o número e tamanho. O grupo periodontite apresentou VL 92,3% maiores do que as VL do grupo controle (Figura 3); este achado é similar ao estudo que avaliou o acúmulo de gordura no fígado de ratos tratados com etanol (EID et al., 2013). Uma outra alteração observada foi que o número de VL no grupo periodontite foi 53,1% maior, como visto na figura 3. VL ocupam o citoplasma dos hepatócitos, diminuindo funções celulares (FELDSTEIN et al., 2011). VL não são apenas inclusões, mas organelas que exercem diversas atividades biológicas, dentre elas o equilíbrio dos lipídeos sanguíneos (WALTHER et al., 2009), de acordo com nossos resultados para os níveis elevados de colesterol total e triglicerídeos tanto no sangue como no fígado.

Nós demonstramos previamente (CARVALHO et al., 2017) que o perfil lipídico dos ratos com periodontite foi similar a estes dados (Tabela 1). Uma hipótese emergente está associando o metabolismo lipídico com o envolvimento de bactérias periodontopatogênicas aumentando o risco do desenvolvimento e/ou progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (YONEDA et al., 2012; KOMAZAKI et al., 2017). Mais investigações poderiam esclarecer a associação entre a periodontite e os mecanismos de desenvolvimento da DHGNA. Além disso, o modelo de periodontite induzido com ligadura é a atual forma de simular a relação entre as bactérias associadas à periodontite e seus efeitos sistêmicos.

Em relação à avaliação ultraestrutural, nós observamos que as mitocôndrias dos hepatócitos do grupo periodontite estavam maiores do que as do grupo controle. Ainda, as mitocôndrias dos animais com periodontite apareceram menos elétrons densas e com as cristas mitocondriais menos distinguíveis da membrana mitocondrial, como demonstrado em ratos com diabetes induzida com aloxana (Lucchesi et al., 2015). As mitocôndrias têm importante papel na produção de ATP e aumento de estresse oxidativo está associado com falha nessa produção de ATP, causando danos mitocondriais (FELDSTEIN et al., 2011). Estes resultados estão de acordo com níveis aumentados de GSH, MDA e NO_3/NO_2 , como também mudanças ultraestruturais observadas no tamanho das mitocôndrias.

Nós especulamos que o aumento de marcação para FAL no fígado dos animais está associado com o LPS bacteriano envolvido na periodontite (YONEDA et al., 2012; KOMAZAKI et al., 2017), porque a FAL medeia a interação bactéria-hospedeiro por meio da capacidade de desfosforilar o lipídeo-A da parede celular do LPS bacteriano (LALLÈS, 2010). Além disso, a atividade da FAL está relacionada com o metabolismo lipídico (LYNES et al., 2011). Nossos dados para a FAL são suportados por prévios achados e trazem a associação com a periodontite induzida, ainda não relatada na literatura.

A periodontite experimental causou mudanças nas VLs, mitocôndrias RER e REL, quando analisados pelo MET. Os hepatócitos do grupo periodontite mostrou significativa dilatação nas cisternas do RER, em comparação com o grupo controle, como visto na figura 4. Similarmente, o REL também apresentou diferenças, que estão possivelmente associadas com o desequilíbrio no estresse oxidativo causado pela periodontite. O REL das ratas com periodontite demonstrou *foamy* citoplasmático (Figura 5C, D e E), resultado da proliferação do REL e acúmulo de glicogênio (Figura 3D e figura 5F). Tais achados inéditos em relação a ultraestrutura dos hepatócitos são similares àquelas encontradas em humanos com DHGNA (AHISHALI et al., 2010), embora estes achados devam ser interpretados com cautela, porque a periodontite em modelo animal induzida com ligadura seja rápida e severa em sua instalação e progressão, diferente do humano.

Conclusão

Nós demonstramos alterações na estrutura, ultraestrutura e função hepática de ratos com periodontite induzida com ligadura. Este é o primeiro estudo na literatura demonstrando um significativo aumento no número de hepatócitos binucleados, do metabolismo lipídico e vesicular (FAL positivos), aumento no tamanho e número das VLs, aumento na distância entre as cisternas do RER, aumento no tamanho das mitocôndrias, *foamy* citoplasmático e acúmulo de glicogênio no fígado de ratos com periodontite.

Referências

- ABD EL-KADER S. M.; EL-DEN ASHMAWY E. M. Non-alcoholic fatty liver disease: the diagnosis and management. **World Journal Hepatology**, v. 7, p. 846-858, 2015.
- AHISHALI E. et al. Electron microscopic findings in non-alcoholic fatty liver disease: is there a difference between hepatosteatosis and steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 5; p. 619-626, 2010.
- AKINKUGBE A. A., et al. Periodontitis and non-alcoholic fatty liver disease, a population-based cohort investigation in the study of health in Pomerania. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 1077-1087, 2017.
- BEDOGNI G., et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. **Hepatology**, v. 42, p. 44-52, 2005.
- CARVALHO J. S., et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, p. 883-892, 2017.
- CHAPPLE I. L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 287-296, 1997.
- CHAVES L. S., et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology ad Immunotoxicology**, v. 35, p. 93-100, 2013.
- EID N., et al. Elevated autophagic sequestration of mitochondria and lipid droplets in steatotic hepatocytes of chronic ethanol-treated rats: an immunohistochemical and electron microscopic study. **Journal of Molecular Histology**, v. 44, p. 311-326, 2013.
- EKE P. I., et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. **Journal Periodontology**, v. 86, p. 611-622, 2015.
- ELKHATEEB A., et al. Effect of *Nigella sativa* Linn oil on tramadol-induced hepato- and nephrotoxicity in adult male albino rats. **Toxicology Reports Journal**, v. 2, p. 512-519, 2015.
- EVERARD A., et al. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. **Microbiology**, v. 10, 2014.
- FELDSTEIN A. E.; BAILEY S. M. Emerging role of redox dysregulation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, p. 421-424, 2011.
- FOLCH J., et. al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biology Chemical**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FRANÇA, L. F. C., et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress

and lipid peroxidation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 6, p. 568-576, 2017.

FRANCESCHINI, B. et al., Increased liver mast cell recruitment in patients with chronic C virus-related hepatitis and histologically documented steatosis. **Journal Viral Hepatology**, v. 14, p. 549-555, 2017.

GHADIALLY, F. N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. London: **Butterworth-Heinemann**; p. 1-775, 1988.

GREEN, L. C., et al., Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochemical**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HANDA, P. et al. Differences in hepatic expression of iron, inflammation and stress-related genes in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Annals Hepatology**, v. 16, p. 77-85, 2017.

HENKEL, J. et al. Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. **Laboratory Investigation**, v. 92, p. 1597-1606, 2012.

KIM, H. M. et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. **Cell Press**, v. 130, p. 906-17, 2007.

KOMAZAKI, R. et al. Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. **Science Report**, v. 1, 2017.

KÖSE, O. et al. Biochemical and histopathologic analysis of the effects of periodontitis on left ventricular heart tissues of rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, p. 176-185, 2017.

LALLÈS, J. P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrition Reviews**, v. 68, p. 323-332, 2010.

LAU E.; CARVALHO, D.; FREITAS, P. Gut microbiota: association with NAFLD and metabolic disturbances. **Biomedicine Research International**, v. 2015, p. 979-515, 2015.

LIN, C. H. et al. Association between periodontitis and the risk of palindromic rheumatism: A nationwide, population-based, case-control study. **PLoS One**, v. 8, p. e0182284, 2017.

LIU, R. et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. **Medical Science Monitor**, v. 18, 2012.

LÓPEZ-NAVARRO, A. T. et al., Morphological changes in hepatocytes of rats deprived of dietary nucleotides. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 579-589, 1996.

LUCCHESI , A. N.; CASSETTARI, L. L.; SPADELLA, C. T. Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. **Journal Diabetes Research**, v. 2015, p. 494578, 2015.

LYNES, M. et al., Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. R1738-47, 2011.

MALHI, H.; GORES. G. J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. **Gastroenterology**, v. 6, p. 1641-1654, 2011.

Marcos, R. et al. Stereological assessment of sexual dimorphism in the rat liver reveals differences in hepatocytes and Kupffer cells but not hepatic stellate cells. **Journal of Anatomy**, v. 228, p. 996-1005, 2016.

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

MIKOLASEVIC, I. et al. Nonalcoholic fatty liver disease - A multisystem disease? **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, p. 9488-9505, 2016.

OLIVEIRA, R. R. et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. **Journal Dental Research**, v, 95, p. 711-718, 2016.

PESSOA, L. S. et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. **Medical Oral and Pathology Oral Cir Bucal**, v. 23, p. e269- 276, 2018.

PETERSEN, P. E. et al., The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organical**, p. 83, p. 661-669, 2005.

POELSTRA, K. et al. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. **Laboratory Investigation**, v. 76, p. 319-327, 1997.

POUPON, R. Liver alkaline phosphatase: a missing link between choleresis and biliary inflammation. **Hepatology**, v. 6, p. 2080-2090, 2015.

SAITO, T. et al. Relationship between periodontitis and hepatic condition in Japanese women. **Journal of International Academy of Periodontology**, v. 8, p. 89-95, 2006.

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.

TAKAHASHI, Y.; FUKUSATO, T. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: overview with emphasis on histology. **World Journal of Gastroenterology**, v. 42, p. 5280-

5285, 2010.

TILG, H.; DIEHL, A. M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1467-1476, 2000.

TOMOFUJI, T. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 78, p. 1999-2006, 2007.

TORMOS-ANA, M. et al. p38 α deficiency and oxidative stress cause cytokinesis failure in hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. S19, 2014.

VASCONCELOS, D. F. P. et al. Decrease in pericytes is associated with ligature-induced periodontitis liver disease in rats. **Journal of Periodontology**, p. 88, p. e49-e57, 2017.

WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. The life of lipid droplets. **Biochim Biophys Acta**, v. 6, p. 459-466, 2009.

WATANABE, E. et al. Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study. **Laboratory Investigation**, v. 89, p. 549-561, 2009.

WHITE, P. et al. Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 12, p. 1041-1049, 2016.

XU, Y.; WEI, W. A comparative study of systemic sub antimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. **Archives Oral Biology**, v. 51, p. 794-803, 2006.

YONEDA, M. et al. Involvement of a periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Gastroenterology**, v. 12, p. 12-16, 2012.

YOUNOSSI, Z. M. et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, p. 665-674, 2005.

PÁGINAS SUPRIMIDAS

DE 61 A 101

Considerações finais

Os resultados apresentados neste trabalho demonstrou que o alfa-terpineol complexado com β -ciclodextrina obteve ação promissora quanto à diminuição da inflamação, estresse oxidativo e dano tecidual causada pela periodontite induzida por ligadura em ratos.

De modo geral, os dados apresentados demonstraram que animais tratados com α -TPN isolado e com o complexado α -TPN/ β -CD melhoraram parâmetros clínicos da periodontite crônica, com diminuição do índice de sangramento gengival, mobilidade dental e profundidade de sondagem. Quanto aos parâmetros indicativos de inflamação (MPO e das citocinas TNF- α e IL-1 β) houve uma melhora significativada após o tratamento dos animais com o complexado, tanto no tecido gengival como hepático. Resultado semelhante também foi observado nos parâmetros indicativos de estresse oxidativo com diminuição nos níveis de nitrito e nitrato e indicadores de peroxidação lipídica como o GSH e MDA. Sobre os parâmetros bioquímicos quantificados no sangue (HDL, triglicerídeos, colesterol total, GGT, ALT, AST e glicose), os animais tratados também tiveram melhoras, sendo melhor observadas com complexado α -TPN/ β -CD . O dano tecidual no fígado também foi reduzido quando observados por análises histopatológicas, morfométricas e de ultraestruturas do hepatócito, demonstrando que a β -CD melhorou as propriedades do α -TPN.

Como perspectivas futuras de exploração da temática pesquisada se propõe a análise dos mecanismos envolvidos na melhora do dano hepático advindo da periodontite crônica.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

a) os hepatócitos dos animais submetidos a indução da periodontite por ligadura apresentam-se alterados ultraestruturalmente com FAL positivos, aumento no tamanho e número das VLs, aumento na distância entre as cisternas do RER, aumento no tamanho das mitocôndrias, *foamy* citoplasmático e acúmulo de glicogênio, sendo predominantemente binucleados;

b) os hepatócitos dos animais submetidos a indução da periodontite e tratamento do α -TPN/ β -CD obtiveram os danos e alterações amenizados em relação ao grau de esteatose, os níveis de MDA e GSH, bem como, o número de VLs e *foamy* citoplasmático que apresentaram significativas melhoras em comparação com os ratos com periodontite quando observados histopatologicamente, morfometricamente e ultraestruturalmente;

c) o α -TPN/ β -CD melhorou os parâmetros clínicos observados na periodontite, com a diminuição do índice de sangramento gengival, mobilidade dental e profundidade de sondagem avaliada;

d) o complexo também melhorou parâmetros histopatológicos e morfométricos de dano tecidual gengival causados pela periodontite nos animais induzidos, assim como evitou a perda óssea alveolar;

e) o α -TPN/ β -CD diminuiu parâmetros indicativos da ocorrência de processos inflamatórios (dosagem de mieloperoxidase, citocinas TNF- α e IL-1 β), o que confirmou a ação anti-inflamatória do complexo no tratamento dos animais induzidos com periodontite, tanto nos parâmetros orais como hepáticos;

f) o α -TPN/ β -CD também diminuiu os parâmetros indicativos de estresse oxidativo (MDA) e o aumento de parâmetros indicativos de proteção tecidual (GSH, nitrito e nitrato) tanto na gengiva como no fígado dos animais induzidos com periodontite; confirmando o seu potencial de ação antioxidante;

g) os parâmetros bioquímicos quantificados no sangue (HDL, triglicerídeos, colesterol total, GGT, ALT, AST e glicose) dos animais tratados com α -TPN/ β -CD também tiveram melhoras significativas, evitando a esteatose hepática causada pela periodontite.

REFERÊNCIAS

AIRILA-MANSSON, S.; SODER, B.; KARI, K.; MEURMAN, J. H. Influence of combination of bacteria on the of prostaglandin E2 , interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.6, n. 77, p. 1025-1031, 2006.

AKRAM, Z.; ABDULJABBAR, T., ABU HASSAN, M., JAVED, F.; VOHRA, F. Cytokine profile in chronic periodontitis patients with and without obesity: a systematic review and meta-analysis. **Disease Markers**, v. 2016, 2016.

AKRAM, Z.; ABDULJABBAR, T., SAURO, S.; DAOOD, U. Effect of photodynamic therapy and laser alone as adjunct to scaling and root planning on gingival crevicular fluid inflammatory proteins in periodontal disease: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 16, p. 142-153, 2016.

ALDABA-MURUATO, L. R.; MORENO, M. G.; SHIBAYAMA, M.; TSUTSUMI, V.; MURIEL, P. Protective effects of allupurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: modulation NF-KB, cytokine production and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 2, p. 65- 75, 2012

ALVES, C. A. D.; LIMA, D. S. Dislipidemia relacionada à fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 829-837, 2008.

ANDRADE, T. A.; FREITAS, T. S.; ARAUJO, F. O.; MENEZES, P. P.; DÓRIA, G.A.A.; RABELO, A.S.; QUINTANS JÚRNIO, L. J.; SANTOS, MÁRCIO R. V.; BEZERRA, D.P. ; MAIRIM, RUSSO SERAFINI; MENEZES, I. R. A.; Nunes, P. S.; ARAUJO, A. A. S.; COSTA, M. S.; CAMPINA, F. F.; SANTOS, A. T. L.; COUTINHO, H. D. M. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in β -cyclodextrin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 201-207, 2017.

ANJOS, K. S.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; DUARTE, M. C.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUZA, N. A. C.; ROLIM, L. A. MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. HPLC-DAD ANALYSIS, Antinociceptive and anti inflammatory properties of the ethanolic extract of *Hyptis umbrosa* in mice. **EXCLI Journal Experimental and Clinical Sciences**, v. 16, p. 14-24, 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.

BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of health and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v.40, p. 29-49, 2006.

BATHIA, S. P., LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 n. 11, S280-S285, 2008.

BECHMANN, L. P.; HANNIVOORT, R. A.; GERKEN, G.; HOTAMISLIGIL, G. S.; TRAUNER, M.; CANBAY, A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 56, p. 952-964, 2012.

BELLANTI, F.; VILLANI, R.; FACCIORUSSO, A.; VENDEMIALE, G.; SERVIDDIO, G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 173-185, 2017.

BERKOVITZ, K. B. B. Periodontal ligament: Structural and clinical correlates. **Dental Anatomy Dental Update** v. 31, p. 46-54, 2004.

BICAS, J. L., QUADROS, C. P., NERI-NUMA, I. A., PASTORE, G. M. Integrated process for coproduction of alkaline lipase and R-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. **Food Chemistry**, v. 120, p. 452–456, 2010.

BOGDANOS, D. P.; GAO, B.; GERSHWIN, M. E. Liver Immunology. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 567-598, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos

Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área técnica de Saúde Bucal. **Projeto SB 2010: condições de saúde bucal da população brasileira no ano de 2010**. Manual do Examinador. Brasília: 2012.

BROW, L. J.; JOHNS, B. A.; WALL, T. P. The economics of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, n. 29, p. 223-234, 2002.

CARVALHO, J. S.; VASCONCELOS, A. C. C. G.; ALVES, E. H. P.; CARVALHO, A. S.; DA SILVA, F. R. P.; FRANÇA, L. F. C.; NÓBREGA NETO, A. P. R.; DI LEONARDO, D.; SOUZA, L. K. M.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. R.; DE OLIVEIRA, 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.

CHAPPLE, I.L.; MATTHEWS, J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontol 2000**, v. 43, p. 160-232, 2007.

CHIN, Y. T.; CHENG, G. Y.; SHIH, Y. J.; LIN, C. Y.; LIN, S. J.; LAI, H. Y.; WHANG-PENG, J.; CHIU, H. C.; LEE, S. Y.; FU, E.; TANG, H. Y.; LIN, H. Y.; LIU, L. F. Therapeutic applications of resveratrol and its derivatives on periodontitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1403, n. 1, p. 101-108, 2017.

CHUKKAPALLI, S. S.; LELE, T. P. Periodontal cell mechanotransduction. **Open Biology**, v. 8, n. 180053, p. 1-7, 2018.

COLOMBO, A. P. V.; MAGALHÃES, C. B.; HARTENBACH, F. A. R. R.; SOUTO, R. M.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M. Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance. **Microbial Pathogenesis**, v. 94, p. 27-34, 2016.

DAGLI, N.; DAGLI, R. Possible use essential oils dentistry. **Journal of International Oral Health**, v. 6, n. 3, 2014.

DALYs , G. B. D. and H. Collaborators. Global, regional and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v.388, n. 10053, p. 1603-1658, 2016.

DI SOTTO, A.; DURAZZI, F.; SARPIETRO, M. G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and antioxidant activities of some bioflavours from wine. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 60, p. 141–146, 2013.

DIMITRIS, N.; TATAKIS, D. D. S.; PURNIMA, S.; KUMAR, B. D. S. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. **The Dental Clinics of North America**, v. 49, p. 491-516, 2005.

DOYLE, C. J.; FITZSIMMONS, T. R.; MARCHANT C.; DHARMAPATNI, A. A. S. S. K.; HIRSCH, R., BARTOLD, P. M. Azithromycin suppresses *P. gingivalis* LPS-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production by human gingival fibroblasts in vitro. **Clinical Oral Investigations**. v.19, n. 2, p.221–227, 2015.

DUCHENE, D.; BOCHOT, A. Thirty years with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 58-72, 2016.

EKUNI, D.; TOMOFUJI, T.; SANBE, T.; IRIE, K.; AZUMA, T.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, N.; MURAKAMI, J.; KOKEGUCHI, S.; YAMAMOTO, T. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 4, p. 434-442, 2009.

EMINGIL, G.; ATILLA, G., SORSA, T.; LUOTO, H.; KIRILMAZ, L.; BAYLAS, H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v 75, n. 1, p.106–15, 2004.

FENTOGLU, O.; KIRZIOGLU, F. Y.; BULUT, M. T.; DOGUÇ, D. K.; KULAÇ. E.; ONDER, C.; GUNHAM, M. Evaluation of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in patients with Periodontitis and Hyperlipidemia. **Journal of Periodontology**, v. 86, n.5, p. 682-688, 2015.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial activity and essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, v. 20, p. 7329-7358, 2015.

FURUTA, M.; EKUNI D.; YAMAMOTO T.; IRIE K.; KOYAMA R.; SANBE T.; YAMANAKA R.; MORITA M.; KUROKI K.; TOBE K. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.68, p. 27-33, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT; J. L. **Atlas colorido de histologia**. Tradução Beatriz Araujo do Rosário. - 6. ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

GONG, J.; YIN, F.; HOU, R.; YIN, Y.L. Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: potential and challenges in application. **Canadian Journal Animal Science**, v. 94, p.223-242, 2014.

GOUVEIA, D. N.; COSTA, J. S.; OLIVEIRA, M. A.; RABELO, T. K.; SILVA, A. M. O.; CARVALHO, A. A.; DOS SANTOS, R. M.; SANTOS, L. M.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; DOS SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; GUIMARÃES, A. G. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, p. 652-661, 2018.

GUIMARÃES, M. V.; MELO, I. M.; ARAÚJO, A. V. M.; TENAZOA, W. D. V.; RORIZ, F. C. S.; MOREIRA, L. L. K.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Dry extract of *matricaria recutita* L. (Chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 6, 2016.

GOODSON J.M., HAFFAJEE A.D., SOCRANSKY S.S., KENT R., TELES R., HASTURK H. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites.

Journal of Clinical Periodontology, v. 39, p. 525-536, 2012.

GOU, J.; ZOU, Y.; AHN, J. Enhancement of antioxidant and antimicro-bial activities of *Dianthus superbus*, *Polygonum aviculare*, *Sophora flavescens*, and *Lygodium japonicum* by pressure-assisted water extraction. **Food Science and**

Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 283–287, 2011.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature reviews: Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015.

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

HAN, J; MENICANIN, D.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 1, p. 117-130, 2014.

HAN, Y. W.; WANG, X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. **Journal Dental Research**, v. 92, n. 6, p. 485-491, 2013.

HASSAN, S. B.; GALI- MUHTASIB, H.; GÖRANSSON H.; LARSSON, R. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1920, 2010.

HASTURK, H.; KANTARCI, A.; VAN DICKE, T. E. Paradigm Shift in the Pharmacological Management of Periodontal Diseases. **Frontier Oral Biology**, v. 15, p. 160-176, 2012.

HARRATHI, J.; HOSNI, K.; KARRAY-BOURAOUI, N.; ATTIA, H.; MARZOUK, B.; MAGNÉ, C.; LACHAÂL, M. Effect of salt stress on growth, fatty acids and essential oils in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Acta Physiologi Plantarum**, v. 34, p.

129–137, 2012.

HATİPOĞLU, M.; SAĞLAM, M.; KÖSEOĞLU, KÖKSAL, E.; KELEŞ, 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.

HELD, S., SCHIEBERLE P., SOMOZA, V. Characterization of alpha-terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8040-8046, 2007.

HEITZ MAYFIELD, L. J. A.; LANG, N. P. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. **Periodontology 2000**, v. 62, p. 218-231, 2013.

HOSADURGA, R. R.; RAO, S. N.; EDAVANPUTHALATH, R.; JOSE, J.; ROMPICHARLA, N. C.; SHAKIL, M.; RAJU, S. Evaluation of the efficacy of 2% *Ocimum sanctum* gel in the treatment of experimental periodontitis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 5, n. 1, p. 35-42, 2015.

IOANNOU, G. N. The role of cholesterol in the pathogenesis of NASH. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 84-95, 2016.

JAYANTI, I.; JALALUDINN, M.; AVIJEETA, A.; RAMANNA, P. K.; RAI, P. M.; NAIR, R. A. In vitro Antimicrobial Activity of *Ocimum sanctum* (Tulsi) Extract on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 19, n. 4, p. 415-419, 2018.

JING, G.; TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Influence of α -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*. **Botanical Studies**, v. 56, n. 35, 2015.

JUN, M.; JEONG, W. S.; HO, C. T. Health Promoting Properties of Natural Flavor Substances **Food Science and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 329-335, 2006.

KOZIEL, J.; MYDEL, P.; POTEMPA, J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. **Current Rheumatology Reports**, v. 16, n. 408, p. 1-7, 2014.

LANG, N. P.; LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 6. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LEPPILAHTI, J. M.; HERNANDEZ-RIOS, P.A.; GAMONAL, J. A.; TERVAHARTIALA, T.; BRIGNARDELLO-PETERSEN, R.; MANTYLA, P.; SORSA, T.; HERNANDEZ, M. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, p. 348-356, 2014.

LI, L.; SHI, C.; YIN, Z.; JIA, R.; PENG, L.; KANG, S.; LI, Z. Antibacterial activity of α -Terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. **Braslian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1409-1413, 2014.

LIMA, P. S. S.; LUCCHESI, A. M.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; MENEZES, P. P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S. Inclusion of terpenes cyclodextrins: preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V. T.; WANDERLEY, C. W.; NUNES, L. G.; LEITE, L. L.; MIRANDA, S. P.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A.; MAGALHÃES, P. J.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335–2350, 2014.

LIU, T. H.; TSAI, T. Y.; PAN, T. M. The Anti-Periodontitis Effects of Ethanol Extract Prepared Using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. **Nutrients**, v. 10, n. 472, p. 1-13, 2018.

LOSS, B. G. Periodontal medicine: work in progress! **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 6, p. 470-471, 2016.

MARANHÃO, R.C. Metabolismo dos quilomícrons e risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana. **Atheros**, v. 13, n. 3, p. 73-76, 2002.

MARCHESAN, J.; GIRNARY, M. S.; JING, L.; MIAO, M. Z.; ZHANG, S.; ZHANG, S.; SUN, L.; MORELLI, T.; SCHOENFISCH, M. H.; INOHARA, N.; OFFENBACKER, S.; JIAO, Y. An experimental murine model to study periodontitis. **Nature Protocols**, v. 13, p. 2247-2267, 2018.

MAROSO, F. B. **Custo-efetividade do tratamento e manutenção periodontal: revisão de literatura**. 2015. 19f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em saúde coletiva com ênfase em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; SILVA, T. A. A. R.; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A.; PASTORE, G. M.; HYSLOP, S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of Orange essential oil. **Food Chemistry**, v. 116, p.8-12, 2009.

MARTINEZ F.O.; HELMING L.; GORDON S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451-483, 2009.

MENDES, L.; AZEVEDO, N. F.; FELINO, A.; PINTO, M. G. Relationship between invasion of the periodontium by periodontal pathogens and periodontal disease: a systematic review. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 208-215, 2015.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 69, n. 1, p. 7-17, 2015.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

MOGHIMI, M. PARVARDEH, S.; ZANJANI, T. M.; GHAFGHAZI, S. Protective effect of α -terpineol against impairment of hippocampal synaptic plasticity and spatial

memory following transient cerebral ischemia in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, p. 960-969, 2016.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural poly-phenolic compounds: A review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793–829, 2011.

NAKAJIMA, T.; OKUI, T.; ITO, H.; NAKAJIMA, M.; SHIMADA, Y.; TABETA, K.; AKAZAWA, K.; YAMAZAKI, K. Microbiological and clinical effects of sitafloxacin and azithromycin in periodontitis patients receiving supportive periodontal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1779-1787, 2016.

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

NENCINI, C.; GIORGI, G.; MICHELI, L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. **Phytomedicine**, v.14, p.129-135, 2007.

NOGUEIRA, M. N. M.; AQUINO, S. G.; ROSSA JUNIOR, C.; SPOLIDORIO, D. M. P. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v. 63, p. 769-778, 2014.

NOOR, R.; ASTUTI, I.; MUSTOFA, R. Cytotoxicity of α -terpineol in HeLa cell line and its effects to apoptosis and cell cycle. **Journal of the Medical Sciences**, v. 46, n. 01, p. 1-9, 2014.

OCHENG, F.; BWANGA, F.; BOSTRÖM, E. A.; JOLOBA, M.; BORG-KARLSON, A. K.; LINDBERG, T. Y.; OBUA, C.; GUSTAFSSON, A. Essential Oils from Ugandan Medicinal Plants: In Vitro Cytotoxicity and Effects on IL-1 β -Induced Proinflammatory Mediators by Human Gingival Fibroblasts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

OLIVEIRA, J. S.; PINTO, M. S. C.; SANTANA, L. A. B.; PINTO, A. S. B.; DI LEONARDO, D.; VASCONCELOS, D. F. P. Biological Effects of Medicinal Plants on

Induced Periodontitis: A Systematic Review. **International Journal of Dentistry**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

OLIVEIRA, M. G. B.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; ARAÚJO-FILHO, H. G.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; CARVALHO, Y. M. B. F.; SILVA, J. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SCOTTI, M. T.; SHANMUGAM, S.; THANGARAJ, P.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effects in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-Biological Interaction**, v. 254, p. 54-62, 2016.

OLIVEIRA M. G.; MARQUES R. B.; SANTANA, M. F.; SANTOS, A. B.; BRITO, F. A.; BARRETO, E.; O.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, F. R.; BADAUÊ, PASSOS, D.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120-125, 2012.

OZ, H.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

PALWANKAR, P.; RANA, M.; ARORA, K.; DEEPTHY, C. Evaluation of non-surgical therapy on glutathione levels in chronic periodontitis. **European Journal of Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 415, 422, 2015.

PARK, J. W.; YOO, B. C. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and cytokines. **The Korean Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2001.

PARK, S. N.; LIM, Y. K.; FREIRE, M. O.; CHO, E.; KOOK, J. K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 369-372, 2012.

PARK, M. J.; GWARK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural

changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, p.290-296, 2009.

PARVARDEH, S.; MOGHIMI, M.; ESLAMI, P.; MASOUDI, A. α -Terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and tolerance in mice: role of nitric oxide. **Iranian Journal of basic Medical Sciences**, v. 19, p. 201-208, 2016.

PESSOA, L.S. **Avaliação da extensão e severidade dos danos hepáticos causados pela Periodontite experimental**, 2017 Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**, v. 60, p. 15-20, 2012.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, p. 1809-1820, 2005.

PINA, L. T. S.; FERRO, J. N. S.; RABELO, T. K.; OLIVEIRA, M. A.; SCOTTI, M. T.; WALKER, C. I. B.; BARRETO, E. O.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; GUIMARÃES, A. G. Alcoholic monoterpenes found in essential oil of aromatic spices reduce allergic inflammation by modulation of inflammatory cytokines. **Natural Product Research**, [in press], 2018.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

PRESHAW, P. M.; HENNE, K; TAYLOR, J. J.; VALENTINE, R. A.; CONRADS, G. Age-related changes in immune functions (immune senescence) in caries and periodontal diseases: a Systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v 44, n, 18, p. 153-177, 2017.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, M. G. B.; SANTANA, M. F.; SANTANA, M. T.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; DE SOUZA, D. P.; ALMEIDA, R. N. α -

terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 6, p.583-586, 2011.

RAHIME, R. S.; LANDAVERDE, C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome:clinical implications and treatment, **Nutrition Clinical. Practice**, v. 28, p. 40–51, 2013.

RIBEIRO, D. D. S. F.; FREIRE, J. M. O.; TEIXEIRA, A. H.; VAL, D. R. D.; FREITAS, A. R.; GOMES, F. I. F.; SILVA, A. A. R. E.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S. D.; SANTOS, W. P. D; ÁVILA, 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 na experimental modelo f periodontitis in rats: Putative role for cyclooxygenase-2 and IL-1? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018.

REDDY, B.V.; SUNDARI, J. S.; BALAMURUGAN, E.; MENON, V. P: Prevention of nicotine and streptozotocin treatment induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 331, p.127-133, 2009.

RICHARDS, D. Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. **Evidence based Dentistry**, v. 15, n. 3, p.70-71, 2014.

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

RODRIGUES, L. B.; MARTINS, A. O. B. P. B.; RIBEIRO-FILHO, J.; CESARIO, F. R. A. S.; CASTRO, F. F.; ALBUQUERQUE, T, T.; FERNANDES, M. N. M.; DA SILVA, B. A. F.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ARAÚJO, A. A. S.; MENEZES, P. P.; NUNES, I. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; WANDERLEY, I. G.; MENEZES, I. R. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with b-cyclodextrin (b-CD) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 836-846, 2017.

SABINO, C. K. B.; FERREIRA FILHO, E. S.; MENDES, M. B.; SILVA FILHO, J. C.; PONTE, M. P. T. R.; MOURA, L. H. P.; OLIVEIRA, E. C. A. O.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n.5, p. 333-339, 2013.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

SCHOLZ, M.; RESKE, BOHMER, F.; HONUNG, A.; GRABOW, N.; LANG, H. In vitro chlorhexidine release from alginate based microbeads for periodontal therapy. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1-19, 2017.

SEKI, E.; SCHWABE, R. F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 1066-1079, 2015.

SHRIAHRI, T. G.; VASUDEVAN, V.; MANJUNATH, V.; DEVARAJU, D. Potential correlation between chronic periodontitis and cancer – a emerging concept. **Gulf Journal of Oncology**, v. 1, n. 20, p. 20-24, 2016.

SIENKIEWICZ, M.; KOWALCZYK, E.; WASIELA, M. Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.7, n.2, p.133–140, 2012.

SILVA, M. A. G.; AQUINO-NETO, M. R.; MOURA, B. A.; SOUSA, H. L.; LAVOR, E. P. H.; VASCONCELOS, P. F.; MACÊDO, D. S.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitotetapia**, v. 80, p. 506-513, 2009.

SIMA, C.; VAN DYKE, T. E. Therapeutic Targets for Management of Periodontitis and Diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 15, p. 2216-2237, 2016.

SINGH, P.; PANDEY, A; K. Prospective of Essential oil of the genus *Mentha* as biopesticides: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1945, p. 1-14, 2018.

SOOKOIAN. S.; PIROLA, C. J. System biology elucidates common pathogenic mechanisms between nonalcoholic and alcoholic-fatty liver disease. *PLoS One*, v. 8, n.3, p. e58895, 2015.

SREENIVASAN, P. K., GAFFAR, A. Antibacterials as anti-inflammatory agents: dual action agents for oral health. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 3, p.227–239, 2008.

STRUILLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dentistry Journal*, v. 4, p. 37-47, 2010.

STRURSKA, A.; EWA, D.;MAGORZATA P.; PIETRUSKI, J. K.; DYMICKA, V.; KEMONA, H.; ARWEILER, . B.; LILEWSKI, R.; SCULEAN, A. Effect of nonsurgical periodontal treatment in conjunction with either systemic administration of amoxicillin and metronidazole or additional photodynamic therapy on the concentration of matrix metalloproteinases 8 and 9 in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. **BMC Oral Health**, v. 15, n. 63, p. 1-5, 2014.

TAI, Y.; XU, M.; REN, J., DONG, M., YANG, Z., PAN, S.; FAN, G. Optimisation of α -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 954-961, 2016.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6452-6461, 2008.

TARGHER, G.; BYRNE, C. D. G. A perspective on metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease, **Metabolic. Syndrome and. Related. Disorders**, v. 13. n. 6, p. 235-248, 2015.

TEIXEIRA, A. H.; FREIRE, J. M. O.; SOUZA, L. H. T.; PARENTE, A. T.; NAYARA, A. S.; ARRIAGA, A. M. C.; SILVA, F. R. L.; MELO, I. M.; SILVA, I. I. C.; PEREIRA, K. M. A.; GOES, P.; COSTA, J. J. N.; CRISTINO-FILHO, G.; PINTO, V. P. T.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M. *Stemodia marítima* L. Extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 988, p. 1-10, 2017.

TOMAZ-MORAIS, J. F.; BRAGA, R. M.; SOUSA, F. B.; SOUSA, D. P.; PORDEUS, L. C. M., ALMEIDA, R. N.; CASTRO, R. D. Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-) -perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, p. 662-667, 2017.

TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; YAMANAKA, R.; KUSANO, H.; AZUMA, T.; SANBE, T.; TAMAKI, N.; YAMAMOTO, 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.

TOMPKINS, K. A. The osteoimmunology of alveolar bone loss. **Connective tissue research**, v. 57, n. 2, p. 69-90, 2016.

TÓTHOVÁ, L.; CELEC, P. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 1055, p.1-14, 2017.

TRINDADE, F.; OPPENHEIM, F. G.; HELMERHORST, E. V.; AMADO, F.; GOMES, P. S.; VITORINO, R. Uncovering the molecular networks in periodontitis. **Proteomics Clinical Applications**, v. 8, p. 9-10, 2014.

TRITTO, G.; BECHLIS, Z.; STADLBAUER, V.; DAVIES, N.; FRANCÉS, R.; SHAH, N.; MOOKERJEE, R. P., SUCH, J.; JALAN, R. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 55, p. 574-581, 2011.

TSAI, C.; CHEN, H.S.; CHEN, S.L.; HO, Y.P.; HO, K.Y.; WU, Y.M.; HUNG, C.C. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, p. 378-384, 2005.

TUTER, G.; KURTIS, B.; SERDAR, M. Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 72, p. 883-888, 2001.

VAN DE BRAAK, S. LEIJTEN, G. **Essential oils and oleoresins: a survey in The Netherlands and other major markets in the European Union**. Rotterdam: CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, p. 116, 1994.

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. R.; MIKOLASEVIC, I.; MANI, A.; OLIVEIRA, J. S. Decrease of pericytes is associated with ligature-induced Periodontitis liver disease in rats. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 2, p. e49-e57, 2017.

VIGAN, M. Essential oils:renewal of interest and toxicity. **European Journal Dermatology**, v. 20, p. 685-692, 2010.

VU, L. T.;ORBACH, S. M.; RAY, W. K.; CASSIN, M. E.; RAJAGOPALAN, P; HELM, R. F. The hepatocyte proteome in organotypic rat liver models and the influence of the local microenvironment. **Proteome Science**, v. 15, n. 1, p. 12, 2017.

ZHOU, S.; SUN, C; HUANG, S.; WU, X.; ZHAO, Y; PAN, C.; WANG, H.; LIU, J.; LI, Q.; KOU, Y. Efficacy of Adjunctive bioactive materials in the treatment of Periodontal Intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1-15, 2018.

WILLEBRORDS, J.; PEREIRA, I. V. A.; MAES, M.; YANGUAS, S. C.; COLLE, I.; BOSSCHE, B. V. D.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, C. P.; ANDRAUS, W.; ALVES, V. A. F. COGLIATI, B.; VINKEN, M. Strategies, models and biomarkers in experimental

non-alcoholic fatty liver disease research. **Progress Lipid Research**, v. 59, p. 106-125, 2016.

WU, Y. H.; KURAJI, R.; TAYA, Y.; ITO, H.; NUMABE, Y. Effects of theaflavins on tissue inflammation and bone resorption on experimental periodontitis in rats.

Journal of Periodontal Research, 2018

XUE, W.; YU, J.; CHEN, W. Plants and their bioactive constituents in mesenchymal stem cell-based periodontal regeneration: a novel prospective. **Biomed Research International**, p. 1-15, 2018.

YANG, Z.; LI, Y.; MA, X.; SHEN, L.; ZHAO, Z.; JIN, F. Role of the epithelial cell rests of malassez in periodontal homeostasis and regeneration – a review. **Current Stem Cells Research and Therapy**, v. 10, n. 5, p. 398-404, 2015.

YIN, M.; WHEELER, H. K.; BRADFORD, B. U.; GALLUCE, M. I.; LUSTER, R. G. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice, **Gastroenterology**, v. 117, p. 942- 952, 1999.

YUE, W.; ANDRUKHOV, O.; RAUSCH-FAN, X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. **Frontier in Physiology**, v. 8, n. 910, p. 1-13, 2017.

ZEIDA ´N-CHULIA ´, F.; OLIVEIRA, B. N.; GURSOY, M.; KÇNÇNEN, E.; MOREIRA, J. C. F.; GURSOY, U. K.; UITTO, V. J. MMP • REDOX/NO Interplay in Periodontitis and Its Inhibition with *Satureja hortensis* L. Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 507-523, 2013.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control**, v.37, p. 277-283, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de publicação de artigo científico oriundo da tese no periódico internacional Journal of Periodontology (DOI: 10.1002/JPER.18-0226; Qualis B1 em Biotecnologia; Impact Factor 3,392).

Received: 12 April 2018 | Revised: 14 June 2018 | Accepted: 20 June 2018
DOI: 10.1002/JPER.18-0226

ORIGINAL ARTICLE



Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats

Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos^{1,2} | Daniel Fernando Pereira Vasconcelos³ |
Felipe Rodolfo Pereira da Silva³ | Luiz Felipe de Carvalho França³ | Even Hertany Pereira Alves³ |
David Di Lenardo³ | Larissa dos Santos Pessoa³ | Pedro Duarte Novaes⁴ |
André Luiz dos Reis Barbosa⁵ | Arya Mani⁶ | Flávia Sammartino Mariano⁴ |
Jand-Venes Rolim Medeiros⁵ | Aldeidia Pereira de Oliveira¹

¹Medicinal Plants Research Center (NPPM), Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

²Medicine School, Education Institute of Parnaíba Valley (IESVAP), Parnaíba, PI, Brazil

³Laboratory of Histological Analysis and Preparation (LAPHIS), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

⁴Piracicaba Dental School, State University of Campinas – UNICAMP, Department of Morphology, Division of Histology, Piracicaba, SP, Brazil

⁵Laboratory of Experimental Phytopharmacology (LAFPEXO), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

⁶Yale Cardiovascular Research Center, Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Correspondence

Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Ministro Reis Veloso, Colegiado de Biotecnologia, Av. São Sebastião, 2819, Reis Veloso, Parnaíba – PI – Brazil.
Email: vasconcelos@ufpi.edu.br

Abstract

Background: Periodontitis not only causes injury to the periodontium, but also damages other tissues such as: articulate, renal, cardiac, and hepatic. The objective of this study was to investigate periodontitis induced alterations in liver function and structure using an experimental model.

Methods: Twenty female rats (*Rattus norvegicus*) were allocated into two groups: control and periodontitis. Gingival bleeding index and oxidative stress parameters and specific circulating biomarkers were measured. Immunohistochemistry was carried out using alkaline phosphatase (Akp) staining of the liver. Hepatic tissues, cytokines, and lipid contents were measured. Histopathologic evaluation of the liver was carried out using light and electron microscopy.

Results: Liver histopathologic and immunohistochemistry assessment showed increase in steatosis score, and presence of binucleate hepatocytes and positive cells for Akp in periodontitis versus control group. Ultrastructural evaluation showed significant increase in size and number of lipid droplets (LD), distance between the cisterns of rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria size, foamy cytoplasm, and glycogen accumulation in the liver of the periodontitis group compared with the control group. In addition, plasma levels of Akp, high-density lipoprotein (HDL), triglycerides, and total cholesterol were also changed.

Conclusion: Experimental periodontitis caused immunohistochemistry, histopathologic, ultrastructural, oxidative, and biochemical changes in the liver of rats.

KEYWORDS

cytokines, inflammation, liver, oral medicine, periodontal diseases

Periodontitis is an infectious and inflammatory oral disease, affecting 30% to 45% of the adults worldwide.^{1,2} Tissue damage caused by periodontitis results from imbalances in the host response caused by bacteria, periodontal pathogens, and other end-metabolites that stimulate the overproduction of inflammatory mediators. Reactive oxygen and nitrogen species

(ROS/RNS) released by defense cells in response to bacteria, periodontal pathogens, end-metabolites, and lipopolysaccharides (LPS) contribute to periodontal damage.^{3–5}

Periodontitis not only causes injury to the periodontal tissues but also damages other tissues such as: articulate,⁶ renal,⁷ cardiac,⁸ and hepatic.^{9–12}

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo científico oriundo da tese no periódico internacional Journal of Periodontology (Qualis B1 em Biotecnologia; Impact Factor 3,392).

14-Feb-2019

Dear Dr. Vasconcelos:

Thank you for submitting your manuscript, "Alpha-terpineol complexed with beta-cyclodextrin reduces damages caused by periodontitis in rats" (JOP-19-0103), to the Journal of Periodontology. Your manuscript will be forwarded to Dr. Kornman or an Associate Editor prior to peer review.

As a reminder, the Journal of Periodontology requires all authors to complete a conflict of interest and financial disclosure form via the submission site. You will receive a separate e-mail with information regarding the form.



You may track the status of your submission on the web at <https://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. To access the system, you will need to login with your User ID and password. The manuscript status can be tracked in your Author Center.

If you have any questions, or if I can provide further information, please do not hesitate to contact me at julie@perio.org. It will be most helpful if you would include both your manuscript title and reference number in any correspondence.

Sincerely,

Julie Daw
Managing Editor
Journal of Periodontology
E-mail: julie@perio.org
<https://mc.manuscriptcentral.com/jperio>

ANEXO C – Comprovante de submissão de artigo científico oriundo da tese no periódico International Journal of Biological Macromolecules (Qualis A2 em Biotecnologia; Impact Factor 3,667).

 International Journal of Biological Macromolecules <Evisesupport@elsevier.com>
Ter, 12/02/2019 11:44
Você 

Dear Professor Vasconcelos,

Submission no: IJBIOMAC_2019_1050
Submission title: Characterization and comparative analysis of the effects of the alpha-terpineol alone and complexed with beta-cyclodextrin in the experimental periodontitis
Corresponding author: Professor Daniel Vasconcelos
Listed co-author(s): Dr. Adriano Araújo, Mr Luiz Felipe de França, Professor Lucindo Quintans Júnior, Dr Jand Medeiros, Mr Bruno Lima, Ms Francisca Sousa, Dr Andre Barbosa, Mr Hélio Nascimento, Ms Larissa Pessoa, Dr Even Herlany, Mr. Felipe Rodolfo, Dr Aldeidia Oliveira, Professor Any Carolina Cardoso Vasconcelos, Mr David di Lenardo

Professor Vasconcelos has submitted a manuscript to International Journal of Biological Macromolecules and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

ANEXO D – Certificado de aprovação de projeto intitulado "Avaliação do efeito do alfa-terpineol e do alfa terpineol com ciclodextrina sobre o periodonto de ratos" junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o nº de protocolo 384/17.




**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 (88) 3215-5734_e-mail: ceuapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Avaliação do efeito do alfa-terpineol e do alfa-terpineol complexado com ciclodextrina sobre o periodonto de ratos*", registrada nº 384/17, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA** do Departamento de Farmacologia/CCS/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	100
Peso/ Idade	200g/ 12 sem
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 08 de Setembro de 2017.



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