



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

SÉRGIO ARAÚJO HOLANDA PINTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DO α - e β -AMIRINA, EM
MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL E
NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM RATOS**

FORTALEZA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

SÉRGIO ARAÚJO HOLANDA PINTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DO α - e β -AMIRINA, EM
MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL E
NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM RATOS**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos Cunha de Andrade

FORTALEZA

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde
da Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

P731a Holanda Pinto, Sérgio Araújo

Avaliação do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do α - e β -amirina, em modelo de doença periodontal e nocicepção orofacial em ratos/Sérgio Araújo Holanda Pinto. 2008.

132 f: il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. Burseraceae. 2. Triterpenos Pentacíclicos.
3. Periodontite. 4. Medição da Dor. 5. Capsaicina. II. Rao,
Vietla Satyanarayana (orient.). II. Título.

CDD 615.32



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE SERGIO ARAÚJO HOLANDA PINTO, REALIZADA NO DIA VINTE E QUATRO DE SETEMBRO DE DOIS MIL E OITO.

1 Às nove horas do dia vinte e quatro de setembro de dois mil e oito, no Auditório Paulo Marcelo, da
2 Universidade Federal do Ceará, realizou-se a 5ª. Sessão de Defesa da Tese de Doutorado de autoria de
3 SERGIO ARAÚJO HOLANDA PINTO. O trabalho tinha como título: "Avaliação do efeito
4 antiinflamatório e antinociceptivo do α - e β - amirina, um triterpeno pentacíclico do *Protium*
5 *heptaphyllum*, em modelo de doença periodontal e na nocicepção orofacial em ratos". Compunham a
6 Banca Examinadora os professores doutores VIETLA SATYANARAYANA RAO (ORIENTADOR),
7 CLÓVIS MONTEIRO BRAMANTE, MARCÍLIO DIAS CHAVES DE OLIVEIRA, IZAIRA MARIA
8 BRUNO FIGUEIREDO E MARIA MÔNICA STUDART MENDES MOREIRA. A sessão foi aberta pela
9 coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas professora, doutora GEANNE
10 MATOS DE ANDRADE CUNHA, que apresentou a Banca Examinadora e passou a palavra ao
11 orientador afim de que apresentasse o candidato. Após a exposição, seguiu-se o processo de arguição do
12 doutorando. O primeiro examinador foi o professor doutor Clóvis Monteiro Bramante. Logo após
13 procederam à arguição os professores doutores Marcílio Dias Chaves de Oliveira, Izaira Maria Bruno
14 Figueiredo, Maria Mônica Studart Mendes Moreira e Vietla Satyanarayana Rao. Em seguida a Banca
15 Examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade
16 a Banca Examinadora considerou APROVADO o trabalho do doutorando. Nada mais havendo a relatar a
17 sessão foi encerrada às treze horas. E eu, Ivone Mary Fontenele de Sousa, secretária do Programa de
18 Pós-Graduação em Ciências Médicas, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada, será
19 assinada por mim e pelos membros da Banca Examinadora. Fortaleza, vinte e quatro de setembro de
20 dois mil e oito.

Ivone Mary Fontenele de Sousa
(Secretária)

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
(Orientador)

Prof. Dra. Izaira Maria Bruno Figueiredo
(UNIFOR)

Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante
(USP)

Prof. Dr. Marcílio Dias Chaves de Oliveira
(UFRN)

Prof. Dra. Maria Mônica Studart Mendes Moreira
(UFC)

O MANIFESTO DA DOR

*Eu sei que não sou amada.
Na vida sigo ao enlaço de todos,
sem definir tempo, estado,
raça, credo ou situação.
Mister se faz que todos os homens
da terra sintam-me o latejo.
Desde a criação do mundo,
caminho lado a lado nas diretrizes
que o tempo me conduz.
Dizem que com cada semblante triste
que geme aflito,
sou a ferramenta a sulcar "ais" com agonias,
fazendo a lágrima verter
o seu pranto sentido.
Dizem que sou pálida,
como a face que não tem sangue;
perdida, como a mente sem memória;
vazia, como o eco de um grito no precipício;
pontaguda, como o punhal cortante.
E, por onde passo,
provoco sucessivos lamentos
onde pouso vibrante, até que me vou.
Contudo, eu sei que sou:
a energia latente em seu corpo;
a força que indica quando algo não está perfeito;
a perspectiva para a busca do equilíbrio.
Fui criada com duplo sentido para a reflexão:
despertar a ciência para a preservação da vida;
sublimar a paciência em nome da criação;
sou o presente de Deus para a vida;
também sua melhor amiga;
seu porto seguro a preservar o seu corpo com vida,
pelo manifesto da dor.*

JOSEPH
Epígrafe do Livro:
Dor Odontogênica
São Paulo: Artes Médicas, 2001.

*“A dor é uma experiência universal que desconhece países ou fronteiras.
Afeta igualmente homens e mulheres de todas as raças e credos.
A dor é indiferente às condições políticas e sociais e afeta praticamente todos os indivíduos. É uma experiência sensorial individual. Assim, como a fome e a sede, é difícil de ser definida e varia de doente para doente. Nossos conhecimentos sobre seus mecanismos, etiologias e tratamentos ainda estão na infância.
Através da história, a dor só foi ofuscada pelo medo da morte; ainda assim muitos escolheriam morrer a sofrer a devastação da dor inevitável...*

...

Hoje ainda há muitos desafios no entendimento da dor...

...

Enquanto a ciência, graças às pesquisas realizadas, avança rapidamente, é necessário que não percamos a compreensão e a compaixão pelos doentes.”

Gary M. Heir, DMD
Department of Oral Biology, Pathology and Diagnostic Science
of University of Medicine and Dentistry of New Jersey.
Prefácio do Livro:
Dor Orofacial, Diagnóstico, Terapêutica e Qualidade de Vida.
Curitiba: Editora Maio, 2001.

ORAÇÃO À DOR

Dor!

Tu és a sacrossanta mensageira

Da lágrima que afluí aos olhos meus!

Do jardim de meu peito.

Tu és a mais olente flor!

És minha assídua e boa companheira

Nas horas de aflição,

Quando o meu coração

Se entorce, contrafeito,

Nas vascas da agonia!

E Deus, que te enviou para meu peito,

Deus,

Que é justo que é bom e que é perfeito,

Há de fazer de ti minha alegria!

Dizem que és má, no entanto eu te bendigo

E te admiro, ó DOR!

Pois já me acostumei a te hospedar

No humilde alojamento

De meu manguado ser!

E, quando tardas em voltar

A este modesto abrigo,

Eu pressinto o amargor

STEPHANIA ROCHA BEZERRA

*“Das dores a que nós melhor
suportamos é a do próximo”.*

A Deus, que sempre protege
meu lar, minha família.

Aos meus pais, Luiz Holanda
Pinto e Maria de Lourdes
Araújo de Holanda Pinto.

Aos meus sogros, Manoel
Carlos Neto (*In memoriam*) e
Edina da Cunha Sales.

A minha esposa, Lígia Maria
Sales Pinto, e aos meus filhos,
Luiz Holanda Pinto Neto,
Leandro Sales Holanda Pinto
e Lívia Maria Sales Pinto,
com beijos e gratidão pelo
amor, paz e felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao, pela orientação sempre segura, amizade e confiança e que sem exigências me possibilitou realizar esse importante e valioso trabalho para a minha qualificação.

A Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos Cunha de Andrade, que, com muito entusiasmo e confiança me apresentou ao Prof. Rao e pela co-orientação sempre segura e com a devida competência para a realização desse trabalho.

A minha filha Lívia, que, sem se preocupar com sábado, domingo, feriado, dia santo, natal e ano novo, estava sempre com presteza, capacidade e habilidade para me ajudar nos experimentos laboratoriais e na ajuda para elaboração deste trabalho.

Aos meus filhos Luiz e Leandro por sempre me ajudarem nos trabalhos de computação e ajuda para a elaboração deste ensaio.

À Prof^ª. Dr^ª. Flávia de Almeida, docente responsável pelo Laboratório de Produtos Naturais, pela forma cortês e amiga com que sempre me trata.

À Prof^ª. Dr^ª. Gerly Anne de Castro Brito, por sua disponibilidade, conhecimento e leitura das lâminas histológicas e escores estabelecidos para análise estatística

Ao Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior, que, desde os meus trabalhos iniciais no Laboratório de Produtos Naturais, estava sempre à disposição para me ajudar e colaborar nos meus experimentos, e pela amizade.

Ao doutorando Flávio Aragão, pela ajuda na realização dos testes laboratoriais.

À doutoranda Marjorie Moreira Guedes, pela grande ajuda nos experimentos com nocicepção.

À Dr^ª. Adriana Magalhães Andrade, por me haver orientado na anatomia dental dos ratos e ter possibilitado a realização das primeiras cirurgias.

À Prof^a. Rosimary de Souza Carvalho-MS, pelos momentos de estudos, colaboração nas práticas e ajuda na elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Ricardo Sousa Martins-MS, doutorando em Farmacologia e à Prof^a. Dr^a. Maria Mônica Studart Moreira, por terem me cedido parte dos artigos sobre a doença periodontal.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, por estar sempre à disposição em me ajudar e colaborar nos meus trabalhos.

Ao Prof.Dr. Paulo César de Almeida pela a ajuda na análise estatística e oportunas orientações.

Aos amigos da disciplina Endodontia - Professores: Roberto Pinheiro Borges-MS, Prof^a. Dr^a. Mônica Sampaio do Vale e Prof^a. Clarice Eloy da Costa-MS, por suprirem minha ausência nos trabalhos práticos da graduação do Curso de Odontologia.

Ao Sr. José Ivan Rodrigues de Souza, sempre solícito, e pela sua competência na confecção das lâminas para o estudo histopatológico.

Aos funcionários do biotério, senhores: Haroldo e Francisco, pelo eficiente atendimento nas solicitações e trato dos animais.

A todos os professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Médicas da UFC, pelos conhecimentos ministrados para meu crescimento científico.

Aos amigos doutorandos, mestrandos e bolsistas do LPN, Alana, Tiago, Danilo, Iana, Otacílio, Cinthya, Silvéria, Deive, Ítalo, Daniel, Jonnathann, Patrícia e Julliana pela amizade e estarem sempre dispostos a me ajudar.

A Sr^a. Ivone Mary Fontenele de Sousa, secretária do Curso de Mestrado e Doutorado em Ciências Médicas, por estar sempre disposta a ajudar a todos os que a procuram e pela atenção a mim dispensada.

Aos meus irmãos, cunhados, concunhados e a todos os componentes familiares, pela amizade que nos une.

À minha mulher Lígia, que tão bem e com amor zela por mim. Obrigado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DO α - e β -AMIRINA, EM MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL E NOCICEPÇÃO OROFACIAL EM RATOS.

Este estudo avaliou o potencial antiinflamatório do triterpeno α , β -amirina sobre a periodontite nas fases aguda e crônica, em ratos. A periodontite foi induzida pela colocação de ligadura ao redor do 2º molar superior esquerdo. Ratos (n=8) foram pré-tratados com α , β -amirina (5 e 10 mg/kg,v.o). Falso-operados e controles positivos (lumiracoxibe, 20 mg/kg,v.o.e dexametasona, 1 mg/kg, i.p.) foram incluídos. Na fase aguda, os níveis do fator de necrose tumoral (TNF)-alfa no plasma foram medidos e o tecido gengival foi analisado para mieloperoxidase (MPO) e substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS). Tanto α , β -amirina, como dexametasona, diminuiu os níveis de TNF-alfa, MPO e TBARS. Já na fase crônica, após a indução da doença, os animais foram acompanhados e tratados durante 11 dias, avaliando-se, em seguida, o efeito das drogas na variação de massa corpórea e no índice de perda óssea, além de estudo histopatológico do tecido ósseo e da gengiva. Na avaliação da variação da massa corpórea, observou-se que, com α , β -amirina e com lumiracoxibe ocorreu aumento no ganho de peso na massa corpórea, ao passo que, com a dexametasona, ocorreu diminuição, quando comparados com o grupo normal ($p<0,05$). Em relação ao índice de perda óssea, observou-se que α , β -amirina 5 mg/kg não preveniu a perda óssea, não causando, no entanto, aumento, o que ocorreu na concentração de 10 mg/kg e nos controles positivos, lumiracoxibe e dexametasona, quando comparados ao grupo falso-operado ($p<0,01$). Estes resultados permitem concluir que α , β -amirina modulou a inflamação periodontal na fase aguda e demonstrou atividade antiinflamatória na periodontite nas fases aguda e crônica, mas não mostrou capacidade para prevenir a perda óssea. Paralelamente a este estudo, investigou-se, também, o efeito da α , β -amirina em modelo de nocicepção orofacial induzida em ratos por formalina e capsaicina. Os animais foram pré-tratados com α , β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) ou veículo (Tween 80, 3%), recebendo, em seguida, injeção de formalina (1,5 %,20 μ l) ou capsaicina (20 μ l, 1,5 μ g) na parte central da vibrissa direita. Após a análise dos dados, concluiu-se que a α , β -amirina exerceu atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina e formalina.

Palavras chave: *Protium heptaphyllum*; α , β -amirina; periodontites; atividade antiinflamatória; nocicepção orofacial; antinocicepção; formalina; capsaicina.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF α - e β -AMIRINA IN A MODEL OF DISEASE PERIODONTAL AND NOCICEPCION OROFACIAL IN RATS.

This study evaluated the triterpene pentacycle α - β -amyrin anti-inflammatory potential on the stages of periodontitis, acute and chronic, in rats. The periodontitis was induced through ligature placement around the second left upper molar. Rats (n=8) were treated with α , β -amyrin (5 and 10 mg/kg, v.o). Sham-operated and positive-controls (lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o. and dexametasone, 1 mg/kg, i.p.) were included. The TNF-alfa levels in the plasma were evaluated and gingival tissues analyzed for myeloperoxidase (MPO) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Both α , β -amyrin and dexametasone decreased the levels of TNF-alfa, MPO and TBARS. In chronic stage, the animals were observed and treated for a period of 11 days, in which the rats received the same drugs and were evaluated regarding their body mass variation and bone loss index, besides, were submitted to histopathological study of bone and gingival tissues. In the evaluation of the body mass variation, α , β -Amyrin and lumiracoxibe caused an increase in the weight gain, while a decrease occurred in rats treated with dexametasone when compared with the normal group ($p < 0.05$). In relation to bone loss index, it was observed that α , β -Amyrin 5 mg/kg did not prevent bone loss, whereas a concentration of 10 mg/kg displayed an increase in bone loss; this increase also was perceived in the positive controls, lumiracoxibe and dexametasone, in relation to the sham-operated rats group ($p < 0.01$). In conclusion, α , β -amyrin modulates acute phase periodontal inflammation and presents anti-inflammatory activity in both acute and chronic phases, but do not have the capacity to prevent bone loss. In parallel to this study, we also investigated the α , β -amyrin effect in model of orofacial pain induced in rats by formalin and capsaicin. The animals were pre-treated with α , β -amyrin (10, 30, and 100 mg/kg, i.p.), or vehicle (Tween 80, 3%), and than received either formalin (20 μ l, 1.5%) or capsaicin (20 μ l, 1.5 μ g) injection into the vibrissa central right side. After data analysis, it was concluded that α , β -amyrin exerts antinociception effect in experimental model of orofacial pain induced by capsaicin and formalin.

Key Words: Prothium heptaphyllum; α , β -amyrin; periodontitis; anti-inflammatory activity; nociception orofacial; antinociception; formalina; capsaicin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	O periodonto	23
1.2	Inflamação	26
1.2.1	Aspectos gerais da resposta inflamatória.....	26
1.2.2	Inflamação aguda.....	27
1.2.3	Mediadores químicos da inflamação.....	28
1.2.4	Inflamação crônica.....	33
1.2.5	Drogas antiinflamatórias.....	33
1.2.5.1	Lumiracoxibe.....	34
1.2.5.2	Dexametasona.....	35
1.3	A doença periodontal	37
1.3.1	Etiopatogênese da doença periodontal.....	41
1.3.2	Modelo animal da doença periodontal.....	42
1.4	Dor orofacial	44
1.4.1	Mecanismos básicos da dor.....	45
1.4.2	Mediadores inflamatórios.....	47
1.4.3	Classificação da dor orofacial.....	48
1.4.4	Terapêutica para dor orofacial.....	49
1.5	A planta	50
1.5.1	Uso de plantas medicinais.....	50
1.5.2	<i>Protium hepthaphyllum March</i>	51

2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	54
3	OBJETIVOS.....	56
3.1	Objetivo Geral.....	56
3.2	Objetivos Específicos.....	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1	Animais – aspectos éticos.....	57
4.2	Material botânico.....	57
4.3	Protocolo experimental.....	58
4.3.1	Indução da doença periodontal experimental.....	58
4.3.2	Indução da nocicepção orofacial - teste da formalina.....	59
4.3.3	Indução da nocicepção orofacial - teste da capsaicina.....	60
4.4	Grupos experimentais.....	61
4.4.1	Grupos experimentais da doença periodontal (DPE) - fase aguda.....	61
4.4.2	Grupos experimentais da doença periodontal (DPE) - fase crônica.....	62
4.5	Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental - fase aguda....	63
4.5.1	Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	63
4.5.2	Determinação da peroxidação lipídica - TBARS.....	64
4.5.3	Determinação da concentração de TNF- α	65
4.6	Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental - fase crônica..	65
4.6.1	Variação da massa corpórea.....	65
4.6.2	Estudo morfométrico do tecido ósseo na doença periodontal experimental.....	65
4.6.3	Análise histopatológica do osso alveolar.....	67
4.6.4	Análise histopatológica do tecido gengival.....	68
4.7	Análise estatística.....	68
5	RESULTADOS.....	69
5.1	Efeito do α- β-amirina em modelo da doença periodontal experimental - fase aguda.....	69

5.1.1	Efeito do α - β -amirina sobre os níveis de TNF- α em animais submetidos à doença periodontal experimental.....	69
5.1.2	Efeito do α - β -amirina sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal experimental.....	70
5.1.3	Efeito do α - β -amirina sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal experimental.....	71
5.2	Efeito do α- β-amirina em modelo de doença periodontal – fase crônica ...	72
5.2.1	Efeito do α - β -amirina sobre a variação de massa corpórea de animais submetidos à doença periodontal experimental.....	72
5.2.2	Efeito do α - β -amirina sobre o índice de perda óssea (IPO) em maxilas retiradas de animais submetidos à doença periodontal experimental.....	73
5.2.3	Aspecto macroscópico do efeito do α - β -amirina na doença periodontal experimental induzida por ligadura.....	74
5.2.4	Aspecto das alterações histopatológicas do efeito do α - β -amirina na maxila de ratos submetidos à doença periodontal experimental.....	76
5.2.5	Aspecto das alterações histopatológicas do efeito do α - β -amirina em tecidos gengivais de ratos submetidos à doença periodontal experimental.....	79
5.2.6	Efeito do α - β -amirina em modelo de nocicepção orofacial induzida por formalina e capsaicina.....	82
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE FIGURAS

1	Desenho esquemático do dente com seu periodonto.....	25
2 (A)	Fotografia ilustrativa da doença periodontal em humano	40
2 (B)	Imagem radiográfica da doença periodontal em humano	40
3	Principal via somatossensorial da boca e face.....	47
4	Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i>	52
5	Fotografia das folhas e frutos da <i>Protium heptaphyllum</i>	52
6	Estrutura química do α - β -amirina	58
7 (A)	Fotografia da maxila do rato wistar.....	59
7 (B)	Fotografia passagem da agulha-guia por mesial e distal do 2º molar superior do rato.....	59
7 (C)	Fotografia da passagem do fio de náilon em volta do 2º molar superior do rato.....	59
7 (D)	Fotografia da passagem do fio de náilon em volta do 2º molar superior do rato e nó por vestibular.....	59
8	Desenho do local da injeção de capsaicina e formalina na vibrissa direita do rato.....	60
9	Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea.....	66
10	Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre os níveis de TNF- α no plasma na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental.....	70
11	Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe na atividade gengival da mieloperoxidase na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental.....	71
12	Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre os níveis de TBARS gengival na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental	72

13	Efeito do α , β -amirina (5mg/kg, 10mg/kg), dexametasona e lumiracoxibe sobre o ganho ponderal de massa corpórea em animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos.....	73
14	Efeito do α , β -amirina (5mg/kg, 10mg/kg), dexametasona e lumiracoxibe sobre o índice de perda óssea (IPO) na doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos.....	74
15 (A)	Fotografias do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos: normal.....	75
15 (B)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos: submetidos à doença periodontal experimental.....	75
15 (C)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos: falso-operado.....	75
15 (D)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com α - e β -amirina 5 mg/kg, i.p.....	75
15 (E)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com α - e β -amirina 10 mg/kg, i.p.	75
15 (F)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o.....	75
15 (G)	Fotografia do aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com dexametasona 1 mg/kg, i.p.	75
16 (A)	Fotomicrografias de periodonto de rato normal.....	77
16 (B)	Fotomicrografia de periodonto de rato falso-operado.....	77
16 (C)	Fotomicrografia de periodonto de rato submetido à DPE - doença periodontal experimental.....	77
16 (D)	Fotomicrografia de periodonto de animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratado com α , β -amirina 5 mg/kg, i.p.....	77
16 (E)	Fotomicrografia de periodonto de animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratado com α , β -amirina 10 mg/kg, i.p.	77
16 (F)	Fotomicrografia de periodonto de animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratado com lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o.....	77
16 (G)	Fotomicrografia de periodonto de animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratado com dexametasona 1 mg/kg, i.p.....	77

17 (A)	Fotomicrografias de gengivas de rato normal.....	80
17 (B)	Fotomicrografia de gengivas de rato falso-operado.....	80
17 (C)	Fotomicrografia de gengivas de ratos submetidos à DPE - doença periodontal experimental.....	80
17 (D)	Fotomicrografia de gengivas de ratos submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratados com α , β -amirina 5 mg/kg, i.p.....	80
17 (E)	Fotomicrografia de gengivas de ratos submetidos à DPE - doença periodontal experimental e tratados com α , β -amirina 10 mg/kg, i.p.....	80
17 (F)	Fotomicrografia de gengivas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o.....	80
17 (G)	Fotomicrografia de gengivas de ratos submetidos à doença periodontal experimental e tratados com dexametasona 1 mg/kg, i.p.....	80
18 (A)	Efeito do α , β -amirina sobre a nocicepção orofacial induzida por formalina em ratos.....	82
18 (B)	O efeito do α , β -amirina no pré-tratamento com morfina e/ou naloxone sobre o efeito antinociceptivo do α , β -amirina	83
19	Efeito do α , β -amirina sobre a nocicepção orofacial induzida por capsaicina em ratos.....	84

LISTA DE TABELAS

1	Doenças gengivais.....	38
2	Doenças periodontais.....	40
3	Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.....	48
4	Gupos experimentais DPE fase aguda.....	62
5	Gupos experimentais DPE fase crônica.....	63
6	Efeito do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre as alterações nas maxilas observadas na doença periodontal experimental em ratos.....	78
7	Efeito do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre as alterações gengivais observadas na doença periodontal experimental em ratos.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ABP	Osso alveolar propriamente dito
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADP	Difosfato de adenosina
AIDS (SIDA)	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
AP	Processo alveolar
AINEs	Antiinflamatórios não-esteróides
BLI	Bone loss index
C	Complemento
C3a	Complemento 3a
C5a	Complemento 5a
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-1	Ciclooxigenase -1
COX-2	Ciclooxigenase -2
D	Distal
DP	Doença periodontal
DPE	Doença periodontal experimental
EPM	Erro-padrão da média
FAP	Fator ativador plaquetário
G	Gengiva

GMP	Monofosfato de guanosina
H	Histamina
HE	Hematoxilina e eosina
HTBA	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
HT	Hidroxitriptamina
Ig	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intra peritoneal
IPO	Índice de perda óssea
LT	Leucotrieno
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Mesial
mM	Micromolar
MDA	Malon dialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NGF	Fator de crescimento neural
nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
PGs	Prostaglandinas
PGD2	Prostaglandina D2

PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
pH	Potencial de hidrogênio
Pg/ml	Picograma por mililitro
PL	Ligamento periodontal
RC	Cemento radicular
rpm	Rotações por minuto
SBED	Sociedade Brasileira de Estudo da Dor
s.c.	Subcutânea
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substância tiobarbitúrico ácido-reativas
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
U/mg tecido	Unidade de miligrama por tecido
v.o	Via oral

1 INTRODUÇÃO

1.1 O periodonto

O órgão dentário é o conjunto de estruturas anatômicas que completam, ao lado dos dentes, uma das partes fundamentais do grande aparelho mastigatório. É constituído por tecidos especificamente dentários: esmalte, dentina e polpa, e aqueles que os ligam aos maxilares, ou seja, processo alveolar, ligamento periodontal, cimento, elementos de sustentação cuja associação representa o periodonto (FREITAS; ÁLVARES; TAVANO, 1976).

Para melhor compreensão da doença periodontal, é importante o conhecimento da arquitetura normal do periodonto. O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) é dividido em: periodonto de proteção, integrado por gengiva e cuja função é de revestimento, e periodonto de sustentação (inserção), integrado por ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular, cuja função é de sustentação do dente em seu alvéolo (CARRANZA, 1976; LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

A gengiva é a parte da mucosa mastigatória que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Consiste em uma camada epitelial e um tecido conjuntivo subjacente, chamado de lâmina própria. Duas partes da gengiva podem ser diferenciadas: livre e inserida (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

A margem gengival livre, com frequência, é arredondada, de modo a formar uma pequena invaginação ou sulco entre o dente e a gengiva. Geralmente, apresenta largura ao redor de 1 mm e forma a parede de tecido mole do sulco gengival. Quando uma sonda é inserida nesta invaginação e forçada, apicalmente, na direção da junção cimento-esmalte, o tecido gengival é separado do dente, e uma “bolsa gengival” (ou “sulco gengival”) fica aberta artificialmente. O sulco gengival, portanto, é o espaço em torno do dente, limitado de um lado pela superfície dentária, e do outro pelo epitélio que reveste a margem livre da gengiva.

Depois de completada a erupção dentária, a margem gengival livre fica localizada na superfície do esmalte cerca de 1,5 a 2 mm coronariamente à junção cimento-esmalte (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

A gengiva inserida é, na direção da coroa, limitada pela ranhura gengival ou, quando tal ranhura está ausente, por um plano horizontal que passa pelo nível da junção cimento-esmalte. A gengiva inserida estende-se em direção apical até a junção mucogengival, onde se torna contínua com a mucosa alveolar. Com textura firme e tom róseo, a gengiva inserida com frequência mostra uma superfície que apresenta uns pontilhados delicados, o que lhe confere o aspecto de casca de laranja. Este tipo de mucosa está firmemente inserida no osso alveolar e cimento subjacentes por meio de fibras do tecido conjuntivo, portanto, é comparativamente imóvel em relação aos tecidos subjacentes. Na gengiva normal, ou clinicamente sadia, não há “bolsa gengival” ou “sulco gengival”, pois a gengiva está em contato íntimo com o esmalte (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

O ligamento periodontal é o tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e celular, estando incluído no espaço entre as raízes dos dentes e a lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito, tendo uma largura de cerca de 0,25 mm (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

O cimento radicular é um tecido mineralizado, especializado, que reveste as superfícies radiculares e, ocasionalmente, pequenas porções das coroas dos dentes. O cimento desempenha diferentes funções. Ele insere as fibras do ligamento periodontal na raiz e contribui para o processo de reparo após danos à superfície radicular (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

O processo alveolar é definido como as partes da maxila e da mandíbula que formam e dão suporte aos alvéolos dos dentes. Em conjunto com o cimento radicular e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir e absorver as forças geradas, por exemplo, pela mastigação e por outros contatos dentários (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005). A existência deste processo é dependente da formação e da erupção dos dentes, e está sujeito a atrofia em caso de perda do elemento dentário (CARRANZA; NEWMAN, 1996).

A principal função do periodonto (**Figura 1**) é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. Ele forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que é objeto de determinadas alterações com a idade e que, além disso, está sujeita a alterações morfológicas relacionadas a modificações funcionais e no meio bucal (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

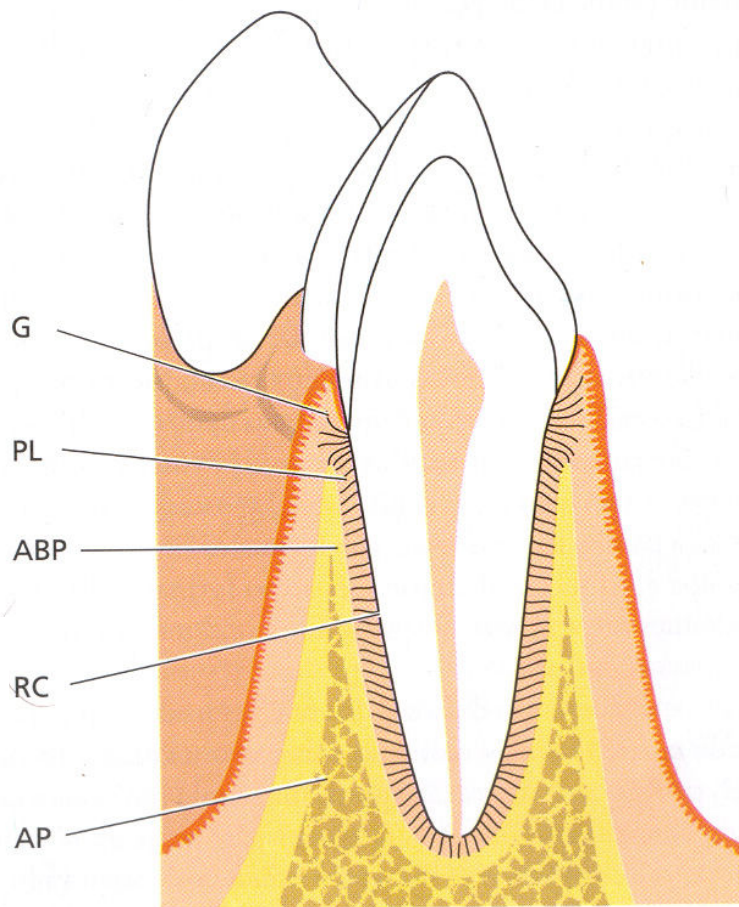


Figura 1 – Desenho esquemático do dente com seu periodonto

G – gengiva, PL – Ligamento periodontal, ABP – Osso alveolar propriamente dito,
RC- Cimento radicular, AP – processo alveolar.

(Desenho adaptado de LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

1.2 Inflamação

1.2.1 Aspectos gerais da resposta inflamatória

O organismo humano possui mecanismo natural de defesa contra o trauma, injúrias ou morte celular, que se chama inflamação. As respostas a essas injúrias se manifestam pela dor, calor, rubor e o inchaço na área afetada. Quando isso acontece, maior quantidade de mediadores químicos vai para essa área, provocando reações teciduais, caracterizadas pela vasodilatação local, aumento da permeabilidade dos capilares com extravasamento de líquido para os espaços intersticiais, migração de granulócitos, monócitos e pela intumescência das células (RODRIGUES; GOTARDI, 2001).

A palavra “inflamação” deriva do latim *flamma* (fogo ou chama) e seu emprego como termo médico decorre da associação entre uma fogueira e as características (quentura, vermelhidão e ardência) de certas lesões da pele. A história conta que as quatro manifestações clínicas da inflamação (rubor, dor, calor e tumefação) foram descritas pelo pensador romano Aulus Celsus já no início da Era cristã (entre os anos 130 e 200), e que o médico grego Claudius Galenus (129-216?) adicionou o quinto sinal: a perda da função. Os estudos sobre os mecanismos patológicos e celulares da inflamação, porém, só tiveram início em 1858, com o patologista alemão Rudolf Virchow (1821-1902). A inflamação é um conjunto de alterações (nos vasos sanguíneos, nos tecidos e nos fluídos internos) provocadas por lesões, infecções, substâncias nocivas ou distúrbios orgânicos. O eritema (rubor ou vermelhidão) e o edema (tumefação ou inchaço) são causados pelo aumento da permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos, permitindo que células sanguíneas e plasma (proteínas do sangue) passem desses vasos para os tecidos vizinhos. Tais células – leucócitos e outras – são ativadas após interagirem com toxinas liberadas por bactérias e com proteínas plasmáticas, e passam a produzir “fatores solúveis”, inicialmente denominados “pirogênios endógenos”, pois têm forte poder de induzir febre e são geradas dentro do organismo. A inflamação, portanto, induz febre e, dependendo da intensidade, pode vir acompanhada de dor e outros efeitos (BELIZÁRIO, 2006).

A inflamação é uma complexa reação do organismo, em especial dos tecidos vascularizados contra estímulos lesivos. Esta reação serve para destruir, matar, diluir ou imobilizar o agente agressor. Microscopicamente, ela envolve uma série de eventos, que

incluem: dilatação de arteríolas, com aumento da permeabilidade e fluxo sangüíneo; exsudação de fluídos, incluindo proteínas plasmáticas; e migração de leucócitos para o foco inflamatório (ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

A inflamação é caracterizada como aguda e crônica. A forma aguda se caracteriza por ter uma curta duração (minutos, horas ou até duas semanas), ter predomínio de neutrófilos e exibir fenômenos vasculares e exsudativos intensos. A de feição crônica possui longa duração (além de duas semanas), é mais específica, suas principais células são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos e exibe fenômenos mais destrutivos e regenerativos do que o processo agudo (BRUNETTI; FERNANDES; MORAES, 2007).

1.2.2 Inflamação aguda

A inflamação aguda é a resposta imediata e precoce a um agente nocivo. Como os dois principais componentes de defesa contra micróbios – anticorpos e leucócitos – são normalmente conduzidos na corrente sangüínea, não é surpreendente o fato de que os fenômenos vasculares desempenham papel importante na inflamação aguda. Por conseguinte, a inflamação aguda possui três componentes principais: (1) alterações do calibre vascular, que acarretam aumento do fluxo sangüíneo; (2) alterações estruturais da microvasculatura, permitindo que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; (3) migração dos leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco de lesão. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por aumento do fluxo sangüíneo para a área lesada, resultante, principalmente, da dilatação arteriolar e da abertura dos leitos capilares. O aumento da permeabilidade vascular leva ao acúmulo de líquido extravascular rico em proteína, o qual forma o exsudato. As proteínas plasmáticas deixam os vasos, mais comumente através das junções alargadas entre as células endoteliais das vênulas ou por lesão direta das células endoteliais. Os leucócitos, inicialmente representados, sobretudo, por neutrófilos, aderem ao endotélio e migram para o local da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos. Segue-se a fagocitose do agente ofensivo, que pode acarretar a morte do microorganismo. Durante a quimiotaxia e a fagocitose, os leucócitos ativados podem liberar metabólitos tóxicos e proteases no meio extracelular, potencialmente causando lesão tecidual (TROWBRIDGE, EMLING, 1996; COLLINS, 2000).

1.2.3 Mediadores químicos da inflamação

A inflamação é controlada pela presença de um grupo de substâncias chamadas de mediadores químicos. Os mediadores originam-se do plasma ou das células. Os mediadores oriundos do plasma (p.ex.complemento) estão presentes no plasma em formas precursoras que devem ser ativadas, em geral, por uma série de clivagens proteolíticas, a fim de adquirir propriedades biológicas. Os mediadores oriundos de células, normalmente, estão seqüestrados nos grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (p.ex., histamina nos grânulos dos mastócitos) ou são sintetizados originalmente (p.ex., prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo. As principais fontes celulares são plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos, mas as células mesenquimais (endotélio, músculo liso, fibroblastos) e a maioria dos epitélios também podem ser induzidos a elaborar alguns mediadores (COLLINS, 2000).

A histamina encontra-se amplamente distribuída nos tecidos, sendo a fonte mais rica os mastócitos, normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos e região subepitelial. Também é encontrada em basófilos e plaquetas sanguíneas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por degranulação dessas células em resposta a uma variedade de estímulos: 1) lesão física, como um traumatismo, frio, ou calor; 2) reações imunes, envolvendo a ligação dos anticorpos nos mastócitos; 3) fragmentos do complemento denominados anafilatoxina (C3a e C5a); 4) proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos; 5) neuropeptídeos (p.ex., Substância P); e 6) citocinas. No ser humano, a histamina causa dilatação das arteríolas e aumenta a permeabilidade vascular das vênulas. É considerada o principal mediador da fase imediata de aumento da permeabilidade vascular, produzindo lacunas venulares (COLLINS, 2000).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é o segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina (TROWBRIDGE; EMLING, 1996; COLLINS, 2000). Está presente nas plaquetas e células enterocromafins, e nos mastócitos em roedores (COLLINS, 2000), sendo, também, sintetizadas e liberadas por mastócitos humanos (KUSHNIR-SUKHOV; BROW; YALIN et al., 2007). A liberação de serotonina das plaquetas é estimulada quando elas se agregam após contato com o colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexos antígeno - anticorpo. A agregação e liberação plaquetárias também são estimuladas pelo fator ativador plaquetário (FAP), proveniente dos

mastócitos, durante reações mediadas por IgE. Desse modo, a reação de liberação plaquetária resulta em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COLLINS, 2000).

O sistema complemento compreende 20 proteínas, encontradas em maior concentração no plasma. Esse sistema funciona na imunidade inata e adaptativa para defesa contra agentes microbianos, culminando na lise de microrganismos, pelo chamado complexo de ataque à membrana. No processo, uma série de componentes do complemento é elaborada causando aumento da permeabilidade vascular (liberação de histamina), no recrutamento de leucócitos fagocíticos (quimiotaxia), na opsonização de alvos para as células fagocíticas e dano direto sobre as células-alvo ou tecidos (TROWBRIDGE; EMLING, 1996; COLLINS, 2000).

O sistema de cininas produz peptídeos vasoativos com base em proteínas plasmáticas denominadas cininogênios por intermédio de proteases específicas chamadas calicreínas (MARGOLIUS, 1995). O sistema de cininas resulta na liberação final do nonapeptídeo vasoativo bradicinina, um potente agente que aumenta a permeabilidade vascular na sua fase tardia (TROWBRIDGE; EMLING, 1996). A bradicinina também causa contração do músculo liso, dilatação dos vasos sanguíneos e dor quando injetada na pele (COLLINS, 2000).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, derivado diretamente de fontes alimentares ou por conversão do ácido graxo essencial, o ácido linoléico. Não ocorre livremente na célula, mas normalmente é esterificado em fosfolipídios da membrana. É liberado de fosfolipídios da membrana pela ativação de fosfolipases celulares (p.ex., fosfolipase A₂) por estímulos mecânicos, químicos e físicos ou por outros mediadores (p.ex., C5a). Os metabólitos do AA, também chamados de eicosanóides, são sintetizados por duas principais enzimas: ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas). Os eicosanóides podem mediar todas as etapas da inflamação. São encontrados em exsudatos inflamatórios e sua síntese é aumentada em locais de inflamação (BOZZA *et al.*, 1997).

Xie *et al.*, em 1992, identificaram duas isoformas da enzima cicloxigenase, com características e ações distintas, denominado-as cicloxigenase 1 (COX-1) e cicloxigenase 2 (COX-2). Vane e Botting (1995) explicaram que a COX-1 está presente na maioria das

células humanas em condições normais de saúde, daí ser chamada de constitutiva. É responsável pela produção de prostaglandina E_2 , envolvida na manutenção da mucosa gástrica, hemodinâmica renal e agregação plaquetária. Já a isoforma COX-2 não é encontrada na maioria das células, mas tem seus níveis aumentados em 80 vezes, localmente, na presença de danos teciduais. Sendo denominada de induzida, é responsável pela síntese das prostaglandinas “patológicas”, associadas com os sinais e sintomas da inflamação, como dor e edema.

Algumas prostaglandinas atuam em conjunto com a histamina e a bradicinina para produzir vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Outras prostaglandinas têm propriedades antiinflamatórias. Drogas antiinflamatórias não esteróides, como a aspirina e a indometacina, inibem a ciclooxigenase e suprimem a síntese de prostaglandinas (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

As prostaglandinas (PGs) também estão implicadas na patogenia da dor e febre na inflamação. A PGE_2 é um mediador hiperalgésico, pois torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos (DRAY, 1995). Causa um aumento acentuado da dor produzida por injeção intradérmica de baixas concentrações de histamina e bradicinina inferiores às ideais e interage com citocinas na geração de febre durante infecções. A PGD_2 é o principal metabólito da via da ciclooxigenase nos mastócitos; juntamente com PGE_2 e PGF_2 , causa vasodilatação e potencializa a formação de edema (COLLINS, 2000).

Importantes produtos da via da lipoxigenase é o grupo das gorduras insaturadas biologicamente ativas, os leucotrienos (LTs). Quando os mastócitos e neutrófilos são estimulados por antígenos, a fosfolipase A_2 é ativada. Ela oxida o ácido araquidônico pela via da lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos. Clinicamente, os leucotrienos mais importantes são LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 . Eles são produzidos pelos neutrófilos e mastócitos. O LTB_4 causa aderência dos neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares e é também um potente quimiotático para neutrófilos. LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade venular (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

Quando vírus ou bactérias patogênicas entram no organismo, uma reação pró-inflamatória começa no local da “invasão”, o que leva dezenas de proteínas celulares de

um tipo específico – as citocinas – a entrar em ação, recrutando e guiando os batalhões de células de defesa imunológica para a área do conflito. Em geral, essa resposta aguda se desenvolve e termina rapidamente. Sob certas circunstâncias, porém, a persistência do agente invasor e a produção contínua e excessiva desses fatores resultam em inflamação crônica. Por outro lado, uma resposta mínima ou ineficiente permite a instalação de infecções generalizadas, que podem levar ao choque séptico e até a óbito, ou podem favorecer a cooperação entre proteínas virais e oncogenes (genes capazes de causar câncer), induzindo a transformação de células normais em tumorais (BELIZÁRIO, 2006).

As citocinas são proteínas produzidas por muitos tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, mas também células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo (COLLINS, 2000; SIQUEIRA, JR; DANTAS, 2000). A forma de ação das citocinas pode ser autócrina (com efeito na mesma célula em que são liberadas), parácrina (com efeito na célula vizinha) e endócrina (com efeito em células distantes) (SIQUEIRA, JR; DANTAS, 2000; ABBAS; LICHTMAN, POBER, 2002; BELIZÁRIO, 2006).

As citocinas formam um grupo diversificado de proteínas de sinalização intercelular, que regulam não apenas as respostas inflamatórias e imunológicas locais e sistêmicas, como também a cicatrização de feridas, a hematopoiese e muitos outros processos biológicos (OPPENHEIM; RUSCETTI, 2000). As citocinas são polipeptídeos produzidos por uma variedade de células do hospedeiro, sendo responsáveis pela modulação da função de diferentes células. Possuem várias funções, dentre as quais de mediadores da inflamação, reguladoras da ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos e outras células, mediadores da resposta imunológica adaptativa (SIQUEIRA, JR; DANTAS, 2000). Tem sido demonstrado que as citocinas afetam a remodelagem óssea e, presentemente, acredita-se que desempenha um papel vital, tanto na regulação fisiológica, como patológica no osso (TANI-ISHII *et al.*, 1999). Em relação à reabsorção óssea, as principais citocinas envolvidas são: interleucina-1(IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF) α , as quais são potentes estimuladores de reabsorção óssea (BERTOLINI *et al.*, 1986; LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004).

O fator de necrose tumoral (TNF) existe em duas formas distintas: alfa e beta. TNF- α é produzido por fagócitos mononucleares, como monócitos e macrófagos, principalmente quando ativados. O TNF- β também é conhecido como linfotoxina e é

produzido por linfócitos T, apresentando várias propriedades da TNF- α . Os principais efeitos do TNF- α são: estimulação da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, tornando-as próprias para a adesão por neutrófilos polimorfonucleares e, subsequentemente, por monócitos e linfócitos; ativação da capacidade citocida de neutrófilos e monócitos; estimulação da produção de IL-1, IL-6 e outras citocinas; ação sobre células de hipotálamo, estimulando a síntese de PGs e, assim, induzindo febre; estimulação da reabsorção óssea, mas em proporções menores que IL-1 (SIQUEIRA, JR; DANTAS, 2000). Avaliando a participação de vários mediadores inflamatórios sobre o recrutamento de neutrófilos no espaço articular de ratos imunodeprimidos, Bombini et al., 2004, concluíram que o fator de necrose tumoral medeia à migração de neutrófilo para a cavidade sinovial durante a inflamação, e que grandes quantidades de TNF- α foram detectados no exsudato, e que drogas como a pentoxifilina e a talidomida poderiam reduzir tanto o influxo de neutrófilos quanto a liberação de TNF- α .

O óxido nítrico (NO), mediador pleotrópico da inflamação, foi descoberto primeiro como fator liberado das células endoteliais que causava vasodilatação ao relaxar o músculo liso vascular – fator de relaxamento derivado do endotélio. O NO é um gás solúvel, produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e neurônios específicos no cérebro. Atua de maneira parácrina sobre células-alvo pela indução do monofosfato de guanosina (GMP), que, por sua vez, desencadeia uma série de eventos intracelulares, produzindo uma resposta, como relaxamento das células do músculo liso-vascular. Como a meia-vida *in vivo* do NO é apenas questão de segundos, o gás atua somente em células na vizinhança de onde ele é produzido. Além de um vasodilatador potente, o NO exerce outros papéis importantes na inflamação: reduz a agregação e aderência plaquetária, inibe várias características da inflamação induzida por mastócitos e serve como regulador do recrutamento de leucócitos. O bloqueio da produção de NO sob condições normais promove rolagem e aderência de leucócitos nas vênulas pós-capilares e a administração de NO exógeno reduz o recrutamento de leucócitos nos processos inflamatórios agudos (COLLINS, 2000).

Os neuropeptídios, semelhantes às aminas vasoativas e aos eicosanoides, participam do desencadeamento de uma resposta inflamatória. Os peptídios pequenos, como a substância P e a neurocinina A, pertencem a uma família de taquicininas neuropeptídicas nos sistemas nervosos, central e periférico. A substância P possui muitas funções biológicas,

incluindo a transmissão de sinais dolorosos, regulação da pressão arterial e estimulação da secreção por células imunes e endócrinas, mas é notável como um mediador potente do aumento da permeabilidade vascular (BOZIC *et al.*, 1996).

1.2.4 Inflamação crônica

A inflamação crônica é considerada aquela de duração prolongada (semanas a meses) na qual a inflamação ativa a destruição tecidual e tentativas de reparação estão ocorrendo simultaneamente. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica começa de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas vezes assintomática. Ela caracteriza algumas das doenças humanas mais comuns e incapacitantes, como artrite reumatóide, aterosclerose, tuberculose e doenças pulmonares crônicas (TROWBRIDGE; EMLING, 1996; COLLINS, 2000).

Diferente da inflamação aguda, manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração, principalmente, neutrofílica, a inflamação crônica se caracteriza por: infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), responsáveis pelo reflexo de uma reação persistente à lesão; destruição tecidual, induzida, sobretudo, pelas células inflamatórias; tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada por proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e fibrose (COLLINS, 2000).

Os macrófagos têm o potencial de serem ativados, um processo que resulta no aumento de tamanho celular, maiores níveis de enzimas lisossômicas, metabolismo mais ativo e maior capacidade de fagocitar e destruir micróbios ingeridos. Numa inflamação de curta duração, se o elemento irritante for eliminado, os macrófagos desaparecerão (por morte ou migração para os vasos linfáticos e linfonodos). Na inflamação crônica, o acúmulo de macrófagos persiste (COLLINS, 2000).

1.2.5 Drogas antiinflamatórias

Atualmente, já se pode classificar os antiinflamatórios não-esteróides (AINES), de acordo com sua seletividade sobre as isoformas da enzima ciclooxigenase (VANE; WARNER, 2000): AINEs não seletivos, que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, como

por exemplo, pode-se mencionar a aspirina, a indometacina e o piroxicam; AINEs seletivos, com “preferência” para a COX-2, mas ainda atuando na COX-1, como a nimesulida e o meloxicam e AINEs específicos, que agem quase exclusivamente na isoforma COX-2, dentre eles o celcoxibe, o etoroxibe e o lumiracoxibe.

Segundo Simon (1996) e Lane (1997), o antiinflamatório com perfil farmacológico ideal é aquele que controla a dor e a inflamação mediadas pela enzima COX-2, sem inibir as funções homeostáticas mediadas pela COX-1. De acordo com os estudos de Kummer; Coelho (2002), os coxibes representam um grande avanço farmacológico pelos menores efeitos colaterais e, conseqüentemente, maior segurança para o sistema gastrintestinal.

Inibidores de COX-2 parecem ser promissores para o controle da dor dental e para o tratamento de suporte da doença periodontal. A analgesia superior e a eficácia sustentada, junto com os reduzidos efeitos colaterais dos inibidores de COX-2 (comparados com os inibidores de COX-1), são mostrados em inúmeros estudos clínicos, em particular, após cirurgia oral. Além disso, drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) são sugeridas por alguns autores para a terapia periodontal, testes experimentais em animais e além de estudos clínicos, mostrando que AINEs estabilizam as condições periodontais mediante a redução da taxa de reabsorção do osso alveolar (HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; TSCHOPPE; KIELBASSA, 2006; AZOUBEL *et al.*, 2007)). Outros estudos, porém, não mostram diferença significativa (BISSADA; NG, 1998). Ao contrário, os ensaios que envolvem o uso da dexametasona demonstraram perda alveolar aumentada do osso no modelo de periodontites induzida por ligadura no rato (CAVAGNI *et al.*, 2005).

1.2.5.1 Lumiracoxibe

O lumiracoxibe é um novo inibidor seletivo de COX-2, estruturalmente distinto de outros nesta classe, o qual não contém o grupo sulfúrico (RORDORF *et al.*, 2005; SCOTT *et al.*, 2004). Ele é rapidamente absorvido, tem uma boa disponibilidade oral e uma meia-vida plasmática curta (SCOTT *et al.*, 2004). Lumiracoxibe, no entanto, também difere dos outros inibidores COX-2 porque ele é ácido, o que promove sua distribuição preferencial no tecido inflamado (ESSER *et al.*, 2005; BRUNE; FURST; 2007), onde a concentração perdura fora

da circulação e permite a administração uma vez ao dia (ESSER *et al.*, 2005; BRUNE; FURST; 2007).

A utilização de antiinflamatórios inibidores seletivos de COX-2 é discutida na literatura, apesar de incipiente, como modulador da progressão da doença periodontal (BEZERRA *et al.*, 2000; HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; GURGEL, 2003; NASSAR *et al.*, 2005; AZOUBEL *et al.*, 2007).

1.2.5.2 Dexametasona

Os glicocorticóides são hormônios esteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (GOODMAN; GILMAN, 2003). A sua síntese e liberação ocorrem naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade sob influência do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). A concentração de corticosteróides endógenos (cortisol, cortisona e corticosterona) na corrente circulatória apresenta-se elevada, pela manhã, e baixa à noite, sendo que fatores psicológicos e certos estímulos, como excesso de calor ou frio, lesões ou infecções, podem afetar a liberação destes glicocorticóides (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005).

Medicamentos contendo glicocorticóides são utilizados na terapêutica, com variadas finalidades. Isso inclui principalmente terapia de reposição hormonal, terapias de imunossupressão, terapia antialérgica e antiinflamatória. Nos tratamentos anti-câncer, os glicocorticóides, também, são muito utilizados, principalmente associados a outros medicamentos (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005).

O emprego dos corticosteróides na terapêutica decorre principalmente do fato de estes apresentarem poderosos efeitos antiinflamatórios e imunossupressores. Eles inibem manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, isto é, não apenas na vermelhidão, calor, dor e edema iniciais, mas também estádios posteriores de cicatrização e reparo de feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica (RANG, *et al.*, 2003; BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005).

Os corticosteróides agem pela inibição da enzima fosfolipase A₂, responsável pela metabolização dos fosfolípídeos da membrana celular em ácido araquidônico, precursor dos leucotrienos e prostaglandinas. A inibição da síntese destes mediadores justifica a maior potência antiinflamatória dos corticosteróides, se comparada com os AINEs (FERREIRA, 1990; VANE; BOTTING, 1995).

A betametasona e a dexametasona são corticosteróides de escolha para uso em Odontologia, por apresentarem uma potência 25 vezes maior do que a hidrocortisona, droga-padrão do grupo (ANDRADE, 2002). Além disso, apresentam maior meia-vida plasmática, que permite o emprego destes medicamentos em dose única pré-operatória (FERREIRA, 1990).

A dexametasona é um glicocorticóide sintético que apresenta atividade farmacológica de dez a vinte vezes maior do que o cortizol e a corticosterona. Este fármaco é um potente antiinflamatório e imunossupressor (RANG *et al.*, 2003), que atua inibindo a transcrição de genes, os quais, após a tradução, originam receptores, proteínas que suprimem citocinas e, também, proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005). Como consequência, ocorre inibição periférica da proliferação de linfócitos T, acompanhada por inibição da migração celular para sítios inflamatórios e controle da recirculação de leucócitos (SORIANELLO *et al.*, 2002). A dexametasona inibe a produção de algumas citocinas inflamatórias induzidas por LPS, diminuindo a ativação macrófágica. Isto é uma clara demonstração de que ela é capaz de modular a inflamação (METZEL *et al.*, 2002).

A administração sistêmica de dexametasona por longo tempo está comumente associada com redução na massa óssea total, a qual é interpretada como aumento na atividade da reabsorção óssea (LUCKERT; RAISZ, 1990).

Cavagni *et al.*, (2005) avaliaram o efeito da dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) na patogênese da doença periodontal induzida por ligadura, com linhas de algodão, em torno do seu 2º molar superior de ratos e concluíram que a dexametasona aumentou a média de perda óssea alveolar quando comparada ao grupo-controle.

1.3 A doença periodontal

Perante diversos estímulos, o periodonto reage mediado por processos inflamatórios agudos e crônicos, tradicionalmente divididos em duas categorias principais: gengivites e periodontites. Segundo Mezzomo e Oppermann, 1997, há uma tendência atual de se estabelecer o diagnóstico da gengivite, considerando, principalmente, a presença de sangramento gengival, pois nem sempre o rubor e o edema estão presentes.

Trabalhos sugerem que a acumulação da placa microbiana sobre o dente é a causa direta da gengivite (THEILADE *et al.*, 1966; LINDHE; RYLANDER, 1975; BRECX *et al.*, 1987) e que gengivite pode preceder a periodontite (LINDHE; HAMP; LÖE, 1973, 1975; LÖE; MORRISON, 1986; SCHÄTZLE *et al.* 2003, 2004). Løe, Tyheilade e Jensen (1965) e Lindhe *et al.*, (1978) demonstraram que a remoção dessa placa microbiana dos locais com gengivites resultou na resolução da inflamação nos tecidos moles.

A expressão doença periodontal (DP) é usada no sentido amplo para abranger todas as condições patológicas que acometem todas as estruturas do periodonto de proteção (tabela 1) e/ou de sustentação (**tabela 2**) e são classificadas como:

Tabela 1 – Doenças gengivais

Induzidas por placa	Não induzidas por placa
1. Doenças gengivais associadas apenas à placa microbiana. A. Sem fatores locais B. Com fatores locais	1. Doenças gengivais de origem bacteriana A. Associada à <i>Neisseria gonorrhoea</i> B. Associada a <i>Treponema pallidum</i> C. Associada à <i>Streptococcus sp</i> D. Outros
2. Doenças gengivais modificadas por fatores sistêmicos A. Associada ao sistema endócrino Puberdade Ciclo menstrual Gravidez <i>Diabetes Mellitus</i> B. Associada à discrasias sangüíneas Leucemia Outros	2. Doenças gengivais de origem viral A. Infecções por herpes B. Outros 3. Doenças gengivais de origem fúngica A. Infecções por <i>Cândida sp</i> B. Eritema gengival linear C. Histoplasmose D. Outros
3. Doenças gengivais modificadas por medicamentos A. Hiperplasias influenciadas por drogas B. Gengivites influenciadas por drogas associadas a contraceptivos orais Outros	4. Lesões gengivais de origem genética A. Fibromatose gengival hereditária B. Outras 5. Manifestações de condições sistêmicas A. Alterações mucocutâneas B. Reações alérgicas
4. Doenças gengivais modificadas por desnutrição A. Deficiências de vitamina C B. Outros	6. Lesões traumáticas 7. Reações de corpo estranho 8. Outras não especificada

Fonte: DIAS; PIOL; ALMEIDA (2006).

A periodontite resulta da extensão do processo inflamatório iniciado na gengiva para os tecidos de suporte do periodonto e é caracterizada por infiltração de leucócitos, perda do tecido conjuntivo, reabsorção do osso alveolar e do cemento radicular, constituindo a doença periodontal (WILLIAMS, 1990; LASCALA, 1997). A doença periodontal é a causa

mais freqüente de perdas dentárias em humanos e é a doença de maior prevalência associada a perda óssea, incluindo osteoporose (ASSUMA *et al*, 1998).

A doença periodontal é predominantemente inflamatória, com irritação local dos tecidos por produtos de bactérias que colonizam as superfícies dentárias (CARRANZA, 1976). Esses produtos, especialmente lipopolissacarídeos (LPS), iniciam uma resposta local, ativando células, como macrófagos, induzindo-os a sintetizar e secretar várias moléculas, incluindo citocinas IL-1 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), prostaglandinas e enzimas líticas (LEITÃO, 2002). O aparecimento desta doença está associado com o acúmulo de placa microbiana. Sua persistência por longos períodos pode induzir uma inflamação crônica dos tecidos periodontais, levando a reabsorção óssea alveolar e perda do dente (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; CHAMBRONE; CHAMBRONE, 2006; HAYNES, 2006).

A doença periodontal é uma enfermidade inflamatória / imunológica crônica que se estabelece em resposta a antígenos periodontopatogênicos e parece ser decisiva no sentido de proteger contra infecção, porém, pode levar a alterações destrutivas no tecido do hospedeiro. Assim sendo, a doença periodontal é descrita como uma patologia de natureza multifatorial, resultado de uma interação complexa entre microorganismos patogênicos e defesa do hospedeiro, cujo desenvolvimento pode ser modificado por fatores locais (fumo), condições adquiridas (doenças sistêmicas) ou fatores genéticos (GENCO; 1992; PAGE; KORNMAN, 1997; KINANE, PETERSON, STATHOPOULOU, 2006).

Como outros fatores associados à doença periodontal (Fig. 2a, e 2b) estão as experiências traumáticas na vida (HUGOSON; LJUNGQUIST; BREIVIK, 2002), estado de humor depressivo e ansiedade para eventos negativos, tais como a morte em família ou problemas financeiros (HUGOSON; LJUNGQUIST; BREIVIK, 2002; GENCO *et al.*, 1999).

Estudos revelam que indivíduos com relatos de depressão, estresse e com exaustão poderiam ter mais acúmulo de placa microbiana, inflamação gengival e aumento nos níveis de IL- 6 e cortisol no fluido crevicular gengival, quando comparados com controles normais, sugerindo que a depressão pode afetar a função imune, o que pode levar a afetar a saúde periodontal (JOHANNSEN *et al.*, 2006).

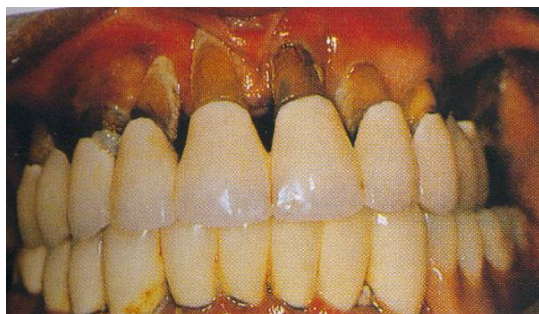


Figura 2 (a) – Cohen; Rose, 1998.



Figura 2 (b)

Figura 2 (a) – aspecto clínico da doença periodontal, observando-se inflamação, retração gengiva/reabsorção óssea. Fig. 2b, aspecto radiográfico da reabsorção óssea na doença periodontal.

As doenças periodontais estão entre as doenças crônicas mais comuns em humanos, afetando 5 a 30% da população adulta de 25 a 75 anos de idade (BROWN; LÖE, 1993).

Tabela 2 – Doenças periodontais

1.Periodontite crônica	4.Doenças periodontais necrosantes
2.Periodontite agressiva	A.Gengivite ulcerativa necrosante
3.Periodontite como manifestação sistêmica	B.Periodontite ulcerativa necrosante
A.Associada a discrasias sangüíneas	5.Abscessos periodontias
Neutropenia adquirida	A.Abscesso gengival
Leucemias	B.Abscesso periodontal
Outros	C.Abscesso pericoronário
B.Associada a distúrbios genéticos	6.Periodontite associada a lesões endodônticas
Neutropenia cíclica e familiar	7.Condições e deformidades congênicas ou
Síndrome de Down	adquiridas
Deficiências de adesão leucocitária	A.Fatores modificadores locais da doença
Síndrome de Papilollon-Lefèvre	gengival ou periodontal, relacionadas
Síndrome de Chediak-Higashi	com dente:
Síndrome de histiocitose	Fatores anatômicos dentais
Doenças de acúmulo de glicogênio	Restaurações/aparelhos dentais
Agranulocitose infantil genética	Fraturas radiculares
Síndrome de Cohen	Reabsorção radicular cervical e desloca-
Síndrome de Ehlers-Danlos	mento do cimento
Hipofosfatasia	B.Deformidades e condições mucogengi-
Outras	vais ao redor do dente
C.Outras não especificadas	C.Deformidades e condições mucogengi-
	vais em rebordos edêntulos
	D.Trauma oclusal.

Fonte: DIAS; PIOL; ALMEIDA (2006).

1.3.1 Etiopatogênese da doença periodontal

Na doença periodontal, tem-se como fator etiológico principal a placa microbiana. Sua patogênese envolve a resposta tecidual (inflamatória / imunológica) do hospedeiro que resulta na destruição dos tecidos de proteção (gingivite) e de sustentação (periodontite) dos dentes (KINANE; LINDHE, 1999; MARTINS; MARTINS, 2007).

A placa microbiana é vista atualmente como um biofilme bacteriano que se forma no sulco gengival, sendo constituída por microorganismos comensais, microorganismos periodontopatogênicos e seus produtos, que agridem o epitélio sulcular e suscitam uma resposta inflamatória no tecido conjuntivo subjacente, contribuindo para a iniciação e progressão da DP. Assim, a doença periodontal não é causada por apenas um microorganismo e sim é resultado de uma infecção mista, sendo a sua composição responsável pelo grau de destruição que ocorrerá no tecido (PAGE; KORNMAN, 1997; BARTOLD; NARAYANAN, 2006; FENG; WEINBERG, 2006; KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006).

O biofilme pode ser supra ou subgengival. No biofilme supragengival, encontram-se, principalmente, espécies microbianas gram-positivas, facultativas e microorganismos fermentativos. Quando da formação do biofilme subgengival, tem-se a substituição para bactérias, predominantemente, gram-negativas, anaeróbicas e com capacidade proteolítica. Estes últimos microorganismos compreendem o grupo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) além do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, considerados patógenos com maior capacidade destrutiva do que outras bactérias que compõem a placa. A capacidade lesiva destes microorganismos decorre principalmente da capacidade de colonizar sítios subgengivais, capacidade invasiva, liberação de proteases e endotoxinas e por sua capacidade de ocasionar uma resposta imune destrutiva (PAGE; KORNMAN, 1997; SEYMOUR; TAYLOR, 2004; KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006).

Quando se comparam os microorganismos comensais e os periodontopatogênicos, pode-se evidenciar que os primeiros contribuem para a manutenção da homeostasia local, recrutando baixos níveis de resposta imune no tecido periodontal mediante a promoção de um grupo de citocinas envolvidas em condições de saúde tecidual. À medida que a integridade do periodonto é mantida, estes comensais não penetram o epitélio e, portanto, não promovem

inflamação no tecido conjuntivo subjacente. Nos estádios iniciais da colonização por microrganismos periodontopatogênicos, certas bactérias são capazes de modular a resposta imune para promover sua colonização, replicação e invasão. À medida que estes microrganismos se multiplicam e liberam suas enzimas proteolíticas, começa a ocorrer a quebra da barreira epitelial. Desta forma, os microrganismos atingem o tecido conjuntivo subjacente ativando uma resposta inflamatória inicial (DIXON; BAINBRIDGE; DARVEAU, 2004; SEYMOUR; TAYLOR, 2004; BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

As bactérias podem causar destruição direta ou indireta pela ativação de vários componentes do sistema de defesa que, quando ativados, podem promover a proteção tecidual à custa de destruição do tecido periodontal (GEMMEL; SEYMOUR, 2004; KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006).

Estudos longitudinais de doenças periodontais em humanos apresentam diversas variáveis interpacientes de controle difícil, como diferentes níveis de atividade da doença, susceptibilidade individual e tempo de progressão da patologia. Diferentes modelos de periodontite em animais são, conseqüentemente, usados para avaliar tanto a patogênese quanto as várias modalidades de tratamento da doença periodontal (KLAUSEN, 1991).

1.3.2 Modelo animal da doença periodontal

Alterações patológicas dos tecidos periodontais de uma variedade de mamíferos são estudadas e descritas na busca por um modelo animal satisfatório com o qual a periodontite em humanos pudesse ser comparada, assim como outras propostas de estudo. Dentre as espécies incluídas, encontram-se pequenos roedores, tais como camundongos, ratos e hamsters; e animais maiores, como cachorros, carneiros e diversos primatas, como babuínos, macacos, chimpanzés e gorilas (LOHINAI *et al.* 2003; NASSAR *et al.*, 2004; SHIBLI *et al.*, 2003; OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002). Dentre estes, os roedores são os mais extensivamente utilizados (PAGE; SCHROEDER, 1982), pois, nos estudos envolvendo tecidos periodontais, estes são comumente empregados por apresentar diversas vantagens em relação a outros animais, como baixo custo, facilidade de manipulação, capacidade de manutenção em condições livres de germes e de desenvolvimento de imunodeficiências (JORDAN, 1971). Além destas vantagens, estes animais são selecionados em razão da similaridade anatômica do seu periodonto com o dos humanos, tendo como diferença,

somente, epitélio crevicular, que no rato é queratinizado e no humano não é (LISTGARTEN, 1975; KLAUSEN, 1991; WEINBERG; BRAL, 1999; PAGE; SCHROEDER, 1982).

A doença periodontal pode ser induzida em ratos por manipulação na dieta, (ROBINSON; HART; PIGOTT, 1991) introdução de microrganismos patogênicos, por meio de injeção única de lipopolissacarídeos (LPS) (*Salmonella typhimurium*) na gengiva vestibular de segundos molares inferiores de ratos (DUMITRESCU *et al.*, 2004); colocação de ligaduras de fio de náilon ao redor de segundos molares superiores, atuando como local para colonização bacteriana (KLAUSEN, 1991), ou por injeção de toxinas bacterianas (KLAUSEN, 1991; LLAVANERAS *et al.*, 1999).

Trabalhos de Lima *et al.*, (2000), Leitão *et al.*, (2002), Leitão *et al.*, (2004), Leitão *et al.*, (2005) mostraram que, após a passagem e amarração de fios de náilon ao redor de dentes de ratos, houve significativa inflamação periodontal com infiltrado inflamatório, migração apical do epitélio juncional, perda óssea interdental e ativação local de osteoclastos. A passagem do fio em volta dos dentes permitiu o acúmulo de bactérias periodontopatogênicas e, em especial, bactérias gram-negativas, as quais possuem lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é um componente da membrana externa das bactérias gram-negativas (GARRISON; NICHOLS, 1989). Estas moléculas são conhecidas por induzir infiltração de leucócitos polimorfonucleares, edema e dilatação vascular em tecidos periodontais inflamados (PAGE, 1991). Os tecidos duros podem ser afetados por LPS por meio da produção de mediadores inflamatórios, como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral (TNF) (LINDEMANN; ECONOMOU; ROTHERMEL, 1988; AGARWAL *et al.*, 1995) ou prostaglandinas (GARRISON; HOLT; NICHOLS, 1988; GARRISON; NICHOLS, 1989), e ativação de osteoclastos subsequente a estimulação osteoblástica (DUMITRESCU *et al.*, 2004). É também postulado o argumento de que o LPS pode ativar osteoclastos por meio de um efeito direto sobre os leucócitos circulantes, sem envolvimento do osteoblasto (JIANG *et al.*, 2002).

1.4 Dor orofacial

Dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente (MERSKEY; BOGDUK, 1994).

Milhares de pessoas, em todo o mundo, sofrem com a sensação de dor, uma experiência única, desagradável e subjetiva. Indivíduos submetidos ao mesmo estímulo nocivo reagem diferentemente, cabendo ao examinador a tarefa de obter informações suficientes para a correta interpretação e significado da dor (FARIAS; VENÂNCIO; CAMPARIS, 2002).

A dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. Constitui a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicossociais e econômicas. Muitos dias de trabalho podem ser perdidos por aproximadamente 40% dos indivíduos. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência aumentou substancialmente nos últimos anos. A incidência da dor crônica no mundo oscila entre 7 e 40% da população e, como conseqüência desta, cerca de 50 a 60% dos que sofrem de tal sensação ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida (SBED, 2005).

Sabe-se que as pessoas, durante sua experiência de dor, têm o comportamento alterado em virtude de ações desencadeadas pelo estímulo doloroso. As atividades rotineiras e cotidianas das pessoas podem ser objeto de alterações, tendo suas atenções desviadas no intuito de aliviar seu desconforto. A dor influencia todos os segmentos da existência das pessoas, na vida profissional, promovendo o aumento do número de faltas ao trabalho em decorrência da procura por assistência. A experiência de dor influencia nos estudos, aumentando a frequência de faltas à escola ou desviando a atenção dos estudantes, dificultando a concentração e o aprendizado. A dor pode também influenciar nas atividades sociais, deixando as pessoas acamadas e afastadas dos parentes e amigos (NARDI, 2003).

Existem três maneiras de mensurar a dor: fisiológica (por exemplo, a relação entre o tecido lesionado e a dor), observacional (dor avaliada por outra pessoa) e a dor mensurada

por meio de auto-relato. Em um estudo com população numerosa é impraticável usar as mensurações observacional e fisiológica para a dor. O método mais freqüente para obter informações epidemiológicas é usando um questionário para captar dados diretamente das pessoas (MACFARLANE *et al.*, 2002).

A dor orofacial é um problema comum a todas as áreas da Odontologia, pois pode ser causada por infecções dentais, cárie, algumas afecções periodontais, aparelhos ortodônticos, próteses mal adaptadas ou doenças outras das estruturas bucais. Adicionalmente, o próprio tratamento odontológico, em geral, determina algum grau de desconforto ou dor (WANNMACHER; FERREIRA, 1999).

A dor orofacial é a queixa mais comum em pacientes que procuram tratamento médico ou dentário. A dor orofacial é freqüente e possui alta prevalência nos distúrbios dentais e temporomandibulares, doenças malignas, mucosite e neurotoxicidade associada à cirurgia e quimio-radioterapia (BENOLIEL *et al.*, 2007; EPSTEIN *et al.*, 2007).

1.4.1 Mecanismos básicos da dor

– Sistema nervoso periférico e dor

As células nervosas, das quais os axônios inervam os tecidos periféricos (neurônios sensoriais aferentes primários), podem ser divididas em três grupos, baseando-se em seus diâmetros e graus de mielinização, ambos fatores influenciando sua velocidade de condução. Fibras A-beta são fibras largas que conduzem impulsos numa variação de 30 a 70 m/s. Muitas dessas fibras são excitadas por estímulo de leve toque e muito poucas são nociceptoras – receptoras que respondem a dano tecidual. Fibras A-delta são levemente mielinizadas e conduzem impulsos numa variação de 3 a 30 m/s e muitas são nociceptoras. Fibras aferentes amielínicas, do tipo C, conduzem impulsos a uma variação de 0,5 a 3,0 m/s e, na maioria, são nociceptores (COSTIGAN; WOOLF, 2000; MCNEIL; DUBNER, 2002).

Existem diferenças distintas nas alterações periféricas que ocorrem após lesão tecidual e neural (DUBNER; BASBAUUM, 1994). O dano tecidual resulta em uma sensibilidade aumentada dos nociceptores no local da lesão. Isso é chamado de sensibilização periférica. Os nociceptores exibem atividade espontânea, limiares reduzidos e reação aumentada a estímulos subseqüentes. A atividade nociceptora aumentada seguida por

alterações funcionais na medula espinhal e cérebro contribuem para dor persistente. Isso é chamado de sensibilização central. Algumas vezes, os nervos começam a se comportar de forma anormal e impulsos são disparados espontaneamente, o que pode levar à sensibilização central (MCNEIL; DUBNER, 2002).

– Sistema nervoso central e dor

Os impulsos carregados por neurônios nociceptores aferentes primários, a partir da face e de grande parte da boca, atingem o tronco encefálico via nervo trigêmeo. Os estímulos nociceptores são retransmitidos por meio do núcleo espinhal trigeminal, particularmente para sua divisão mais caudal chamada subnúcleo caudal. Esse subnúcleo é também chamado de corno dorsal medular em virtude da semelhança em estrutura com o corno dorsal-espinhal, que recebe sinais nociceptivos do restante do corpo. Os sinais do núcleo trigeminal ascendem para centros superiores, incluindo o tálamo e o córtex cerebral. A sinapse entre o neurônio periférico e os neurônios no subnúcleo caudal é um importante local para processamento do sinal. Nesse nível, a informação é modulada por mediadores químicos liberados de terminais de vários grupos de neurônios: neurônios primários aferentes, neurônios dos núcleos trigeminais e neurônios de centros superiores. Projeções descendentes são importantes uma vez que fornecem os meios pelos quais aspectos cognitivos, de atenção e motivacionais da experiência dolorosa modulam a transmissão nas vias dolorosas (MCNEIL; DUBNER, 2002) (**Figura 3**).

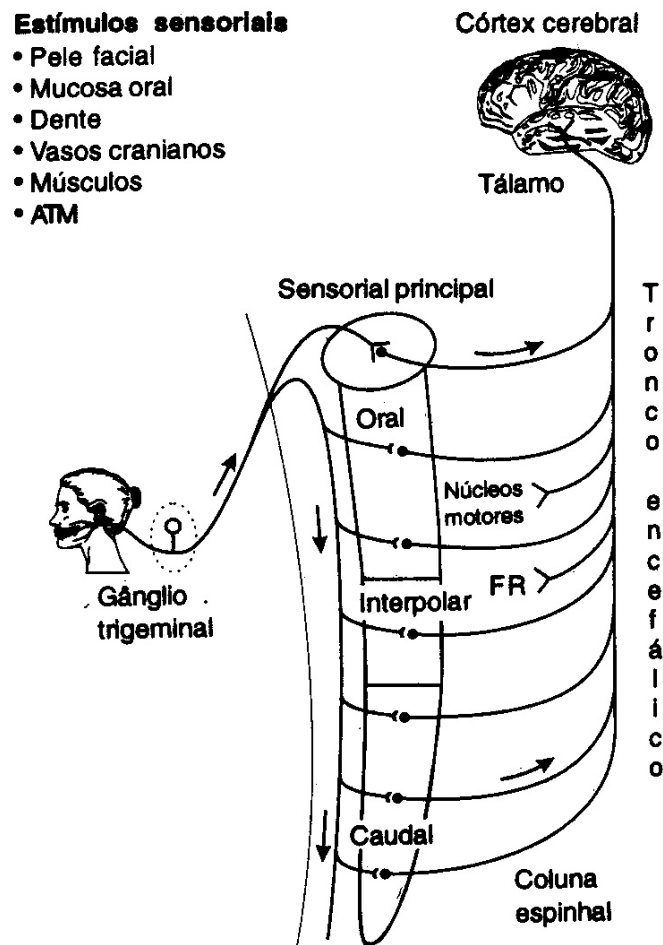


Figura 3 – Principal via somatossensorial da boca e face

Os aferentes primários do trigêmeo (V) têm seus corpos celulares no gânglio e se projetam para os neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensorial V do tronco encefálico. Esses neurônios podem se projetar para neurônios em níveis superiores do cérebro (p.ex., tálamo) ou em regiões do tronco encefálico como os núcleos motores dos nervos cranianos ou formação reticular (FR).

Fonte: Adaptado de Sessle, 2000.

1.4.2 Mediadores inflamatórios

A lesão tecidual inicia a síntese e liberação de substâncias que induzem a inflamação, formação de edema, vasodilatação e migração de células como parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Estes mediadores, entretanto, também ativam e/ou sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal de dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, NO, bradicinina, prostaglandinas, histamina, Substância P e fator de crescimento neural (NGF) (WINKELSTEIN, 2004). Os mediadores inflamatórios, atuando de forma altamente orquestrada, contribuem para mudanças na permeabilidade vascular, resultando em edema e eritema (rubor). Também ocorre

sensibilização dos nociceptores periféricos por início de uma cascata de eventos que muda as condutâncias iônicas da terminação das fibras sensoriais periféricas (ITO; OKUDA-ASHITAKA; MINAMI, 2001). A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que estes disparem com estímulos de menor intensidade (HOLDEN; PIZZI, 2003). Os principais mediadores que participam da nocicepção inflamatória bem como algumas características que devem ser ressaltadas sobre eles estão relacionados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção

MEDIADOR	EFEITO SOBRE NOCICEPTORES	CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Substância P	Ativação e/ou Sensibilização	Hiperalgisia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato	FÜRST(1999) LOFGREN <i>et al.</i> (1999) TURNABACH; RANDICH (2002)
Prostaglandinas	Sensibilização	Hiperalgisia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da ciclooxigenase	MALBERG; YAKSH (1993) BEICHE <i>et al.</i> (1996) TOTANI <i>et al.</i> (1999)
NO	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperalgisia, dependente da concentração	OKUDA <i>et al.</i> (2001) SOUSA; PRADO (2001) DOURSOUT <i>et al.</i> (2003)
BRADICININA	Ativação e/ou Sensibilização	Hiperalgisia mediada por receptores B ₂ constitutivos e B ₁ induzidos, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1.	DRAY (1997) ANDREEVA; RANG (1993) MARCEAU <i>et al.</i> (1998) NI <i>et al.</i> (1998) AUSTIN <i>et al.</i> (1997) FERREIRA <i>et al.</i> (1993)
NGF	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	MARCHAND <i>et al.</i> (2005)
Citocinas pró-inflamatórias: interleucina(IL)-1β,IL-6,IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)-α	Ativação e/ou Sensibilização	Hiperalgisia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática)	FUKUOKA <i>et al.</i> (1994) GEORGE <i>et al.</i> (2005) SCHAFERS <i>et al.</i> (2001) MURPHY <i>et al.</i> (1999)
Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	Ativação e/ou sensibilização	Vasodilatação; extravasamento vascular; inflamação neurogênica	RANG; DALE <i>et al.</i> (2003)

1.4.3 Classificação da dor orofacial

Uma vez que várias condições envolvendo a cabeça e o pescoço se apresentam como dor orofacial, torna-se crítico para todos os profissionais de saúde, a despeito dos

limites disciplinares, possuir extenso conhecimento da variedade de distúrbios que podem ser responsáveis pelos sintomas. Em razão de variadas entidades patológicas apresentarem padrões similares de dor na cabeça, face e pescoço, os profissionais devem considerar doenças não relacionadas ao sistema mastigatório no seu diagnóstico diferencial (MCNEIL; DUBNER, 2002).

A identificação correta de todas as possíveis fontes de queixa do paciente com dor orofacial pode ser uma tarefa intimidadora. Sendo assim, uma abordagem sistemática é essencial. A esfera de ação do profissional de saúde oral inclui: (a) condições dolorosas intra-orais, (b) condições musculoesqueléticas afetando a mandíbula (distúrbios temporomandibulares) e (c) condições médicas que causam dor diretamente na região ou simulam dor orofacial. Distúrbios dolorosos intra-orais incluem condições afetando tecidos duros e moles (dente / osso de suporte), dor mucogengival e lingual e condições dolorosas da glândula salivar. Condições dolorosas musculoesqueléticas afetando a mandíbula incluem distúrbios temporomandibulares e condições cervicais associadas. Condições médicas que podem ser associadas ou confundidas com dor orofacial incluem: distúrbios intracranianos não vasculares, dor neurovascular (cefaléia primária), cefaléias secundárias, dor neurogênica (neuropática), outros distúrbios dolorosos intracranianos (p.ex., condições afetando o ouvido, nariz, seios da face ou garganta) e dores em razão de doenças como câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (OKENSON, 1996; MCNEIL; DUBNER, 2002).

1.4.4 Terapêutica para dor orofacial

Ampla variedade de substâncias é indicada para o tratamento da dor orofacial, incluindo drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs), relaxantes musculares, opióides e antidepressivos, contudo os efeitos colaterais e a toxicidade são aparentes em uma administração de longa duração (DIONNE, 2001). O clínico geral em Odontologia emprega duas classes principais de drogas com propriedades analgésicas: antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e antidepressivos. Embora os opióides tenham papel importante no controle da dor, sua administração pelo clínico geral nos casos de dor orofacial musculoesquelética não é aconselhável, a não ser que seja apoiada e coordenada por médico de assistência primária ou por especialista em dor. As evidências sugerem que os AINEs são superiores aos opióides no controle da dor pós-operatória (STOHLER, 2002).

O tipo de medicação mais comumente usada no mundo, os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) pertencem a uma classe heterogênea de agentes farmacológicos com propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas. É geralmente aceita a opinião de que as propriedades analgésicas dos AINEs estão relacionadas a sua habilidade de bloquear a atividade da cicloxigenase (COX), a enzima que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas. Tornou-se, porém, cada vez mais claro que os AINEs possuem outros mecanismos de ação. Algumas propriedades antiinflamatórias podem estar ligadas a sua habilidade de inibir a ativação do neutrófilos (ABRANSON *et al.*, 1990).

A segunda classe de drogas inclui medicamentos com características antidepressivas que, em virtude das suas modestas propriedades analgésicas, são administradas por um longo período aos pacientes com dor musculoesquelética ou neuropática persistente. Os resultados favoráveis do tratamento são atribuídos ao seu efeito sobre os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgico, os quais exercem influência decrescente nos neurônios do corno dorsal espinhal e trigeminal. Acredita-se que a inibição da atividade dos canais de sódio na membrana neuronal contribua para a analgesia nos casos de neuropatias dolorosas. O benefício adicional dos antidepressivos, provavelmente, vem de sua influência sobre o humor (ABRANSON *et al.*, 1990).

Nos últimos anos, há uma busca constante por drogas alternativas que possuam grande eficácia e segurança na redução da inflamação periodontal, na dor neuropática e inflamatória e com uma estratégia para deter a transição de dor aguda para dor crônica.

1.5 A planta

1.5.1 Uso de plantas medicinais

Em países em desenvolvimento como o Brasil, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajudam a reduzir a importação de drogas e ainda incrementa o desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998). Apesar da rica flora, que representa mais de 20% das plantas conhecidas no mundo, muito pouco é feito no Brasil para estudar o seu potencial como fonte de novas bases medicamentosas ou mesmo como fitoterápicos

(FERREIRA, 1998). A utilização de medicamentos obtidos de plantas medicinais está cada vez mais disseminada, no entanto existe pouco conhecimento sobre seus mecanismos de ação.

Diversas plantas são empregadas em práticas populares para a manutenção da saúde dental (NOSKOV, 1966; DAROUT; ALBANDER; SKAUG; 2000; SASTRAVAHA *et al.*, 2005) e o uso de extratos ervais como enxaguatórios bucais não é raro (PISTORIUS *et al.*, 2003; BOTELHO *et al.*, 2007).

Existe interesse crescente na elucidação dos papéis biológicos dos triterpenos, um dos principais componentes das plantas medicinais, já tendo sido demonstrado que possui atividade hepatoprotetora, analgésica, antitumoral, antiinflamatória e imunomodulatória (MAHATO; SARKAR; PODDAR, 1988; LIU, 1995; LIU, 2005).

Os triterpenos são produtos naturais que pertencem à classe dos terpenos e derivam deles ou dos sesquiterpenos. São moléculas constituídas por trinta átomos de carbono, com seis unidades isoprenóides (com cinco carbonos). Os triterpenos estão divididos em várias famílias, ou seja, em diferentes estruturas de base: o esqualeno, os policíclicos e os triterpenos em geral. Os policíclicos, triterpenóides pentacíclicos, apresentam três tipos de estruturas, que são os oleananos e pertencem a esta família, dentre outros, o β -amirina, os ursanos como a α , β -amirina e o grupo dos lupanos. Em decorrência da sua grande diversidade, o estudo das ações dos triterpenos é de grande interesse na tentativa de reais e novas aplicabilidades (MENDES, 2004).

1.5.2 *Protium heptaphyllum* March

Características gerais

A família *Burseraceae* compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies encontradas na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. Dentre as espécies, há o *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (CORRÊIA, 1984).

Protium heptaphyllum (Aubl.) March (**Figura 4**), conhecida comumente como almécega, é uma árvore perenifólia ou semidecídua, aromática, de 10 a 20 metros de altura, dotada de copa densa e oblonga (alongado, elíptico, oval), com tronco de 40 a 60 cm de

diâmetro, nativa em quase todo o Brasil, principalmente em terrenos arenosos secos ou úmidos, possui folhas compostas pinadas, com 2-4 pares de folíolos glabros coriáceos, de 7-10 cm de comprimento com flores avermelhadas, dispostas em inflorescências fasciculadas axilares. Os frutos (**Figura 5**) são cápsulas oblongas, deiscentes e de tonalidade vinácea, multiplicando-se por sementes (LORENZI, 1992).



Figura 4 – Fotografia ilustrativa da espécie *Protium heptaphyllum*
Fonte: LORENZI, (1992).



Figura 5 – Fotografia ilustrando folhas e frutos da *Protium heptaphyllum*
Fonte: LORENZI, (1992).

Todas as espécies de *Protium* exsudam por incisão do tronco um óleo-resina de tom branco-esverdeado e de aroma agradável, que endurece quando em contato com o ar, denominado de almécega, resina de almécega, breu-branco e breu burceráceas. É um tipo de incenso usado na indústria de perfumaria, farmacêutica e de defumadores místicos. Seu sabor é distintamente pungente, mesmo quando velha e seca, e de odor característico e bem mais forte quando queimado. Suas propriedades são similares aos seus análogos “frankincenso” ou “olibanum” da Índia e África, obtido de árvores da mesma família (PARNET, 1972). Quimicamente, a resina é formada por uma mistura natural de 30% de protamirina, 25% de protelemíca e 37,5% de proteleresina (SCHULTES; RAFFAUF, 1990), constituídas de triterpenos, principalmente das séries oleano, ursano e eufano, com óleo essencial rico em compostos mono e sesquiterpênicos, semelhante ao encontrado em suas folhas (CRAVEIRO; FERNANDES; ANDRADE *et al.*, 1981).

Suas cascas e folhas são amplamente empregadas na Medicina popular caseira em todo o Brasil, embora sem comprovação científica da eficácia e da segurança de suas preparações. A literatura etnofarmacológica registra o emprego de sua casca e folhas como hemostáticas, cicatrizantes e antiinflamatórias, úteis no tratamento de úlceras gangrenosas e inflamações em geral (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Algumas tribos de indígenas da Amazônia usam sua resina como descongestionante nasal nos casos de fortes resfriados, enquanto outras queimam sua resina para aromatizar a coca com sua fumaça (SCHULTES; RAFFAUF, 1990). É também muito usada em substituição ao verdadeiro incenso em atos religiosos da Igreja Católica, principalmente em cidades de ocorrência desta planta (LORENZI; MATOS, 2002).

A resina coletada do seu tronco é um agente curativo eficaz, dotado de propriedades analgésicas e antiinflamatórias (SIANI *et al.*, 1999). O principal componente desta resina é um triterpeno pentacíclico, denominado α e β -amirina (uma mistura isomérica), tendo sido este descrito como possuidor de propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, antinociceptivas, ansiolítica e antidepressiva, e gastroprotetoras em trabalhos anteriores (KATERERE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; ARAGÃO *et al.*, 2006; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2006). Em virtude destas propriedades, a expectativa é de que α e β -amirina possa ser um antiinflamatório ideal para combater a progressão da doença periodontal. Este composto já demonstrou potente ação antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante e antimicrobiana. Espera-se que, com estas ações, ele consiga inibir o processo inflamatório e a osteoclastogênese envolvidos na doença periodontal.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Nas periodontites de evolução que ainda não chegou a comprometer significativamente a estrutura óssea de sustentação, o tratamento tradicional adotado é à base do controle do biofilme subgengival mediante a raspagem para eliminar os depósitos bacterianos e cálculos aderidos às superfícies radiculares, e conter o processo inflamatório conseqüente à presença bacteriana. Os processos imunopatológicos, entretanto, desencadeados em casos avançados, parecem requerer, adicionalmente, a contenção das respostas imunes patogênicas. Sob essa óptica, tratamentos a base de substâncias que “modulam” as respostas imunes do organismo podem ser coadjuvantes importantes ao tratamento convencional, no combate ao avanço da periodontite crônica no humano. Estudos experimentais, realizados por Rossomando e White (1993), comprovam que a neutralização de alguns mediadores dos macrófagos ativados, como as citocinas pró-inflamatórias e metaloproteínas (colagenase tipo VI), de fato, proporcionam resultados significativos na contenção dos processos destrutivos da periodontite crônica.

O controle do biofilme bacteriano dentro das diversas especialidades odontológicas é de grande importância, pois aponta tanto para a prevenção como para o tratamento, da cárie e de doenças periodontais. Com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene bucal (escovação, fio ou fita dental), muitos agentes químicos são estudados, entre eles, antibióticos, compostos quaternários de amônio, acetato e gluconato de clorexidina e outros (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Outros ativos, como os antiinflamatórios e anti-sépticos, também são usados amplamente para afecções da mucosa bucal.

A eficácia de plantas medicinais, como componentes tanto nos géis dentifrícios, como nos enxaguatórios bucais, é investigada para o tratamento de gengivites. Os resultados sugerem que os ingredientes de origem vegetal podem ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (WILLERSHAUSEN; GRUBER; HAMM, 1994).

Dados sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais e fitofármacos, avaliada em relação a microorganismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais, são relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados (NASCIMENTO; LOCATELLI; FREITAS, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar um possível efeito antiinflamatório e osteoprotetor da α , β -amirina em um modelo de doença periodontal e seu efeito antinociceptivo orofacial em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito antiinflamatório da α - e β -amirina na fase aguda da doença periodontal experimental induzida por ligaduras em ratos, utilizando os seguintes parâmetros:
 - quantificação dos níveis de TNF- α ;
 - avaliação da peroxidação lipídica; e
 - avaliação da atividade da mieloperoxidase.

- b) Avaliar o efeito antiinflamatório da α - e β -amirina na fase crônica da doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos, utilizando os seguintes parâmetros:
 - estudo da variação na massa corpórea dos animais;
 - avaliação do índice de perda óssea; e
 - avaliação histopatológica dos tecidos periodontais e gengivais.

- c) Avaliar o efeito antinociceptivo da α - e β -amirina sobre modelo de nocicepção orofacial induzida por formalina e capsaicina em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais – aspectos éticos

Na presente pesquisa foram utilizados 160 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 160-200g, obtidos do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (Faculdade de Medicina - UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 4, em sala com temperatura controlada e recebendo ração comercial balanceada (“Purina Chow”) e água à vontade e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os procedimentos cirúrgicos e o tratamento dos animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde, Betsida, e Comitê de Ética em Pesquisa Animal - CEPA - da Universidade Federal do Ceará, o qual aprovou os protocolos experimentais (Documento n ° 056/07 de 07 de agosto de 2007), para investigação in anima vili.

4.2 Material botânico

O exsudato resinoso do tronco da *Protium heptaphyllum* (March.) foi coletado das áreas municipais de Timom, Maranhão-Brasil, após sua identificação pela botanista Roseli Farias de Melo Barros e catalogada como exsicata de número n° 18.247. Foi depositada no Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil. A extração e o isolamento de α , β -amirina (**Figura 6**) foi realizada, como descrito anteriormente (VIEIRA-JUNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005), por Mariana Helena Chaves, do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, e sua identidade estrutural (**Figura 6**) foi confirmada por análises espectrais ^1H -e ^{13}C -NMR, baseadas no método

desenvolvido por Gallegos e Roque (1990) e em comparação com a literatura atual (MAHATO; SEM, 1997).

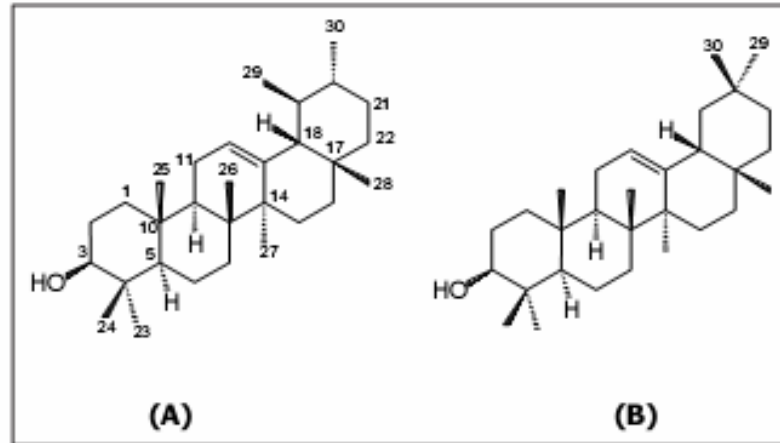


Figura 6 – Estrutura química do α - amirina (A) e β -amirina (B)

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Indução da doença periodontal experimental

Usou-se o modelo de doença periodontal experimental desenvolvido pelos autores (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH, 1978) e modificado (LIMA *et al.*, 2000) no Laboratório de Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina–UFC.

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg), via intraperitoneal (i.p.), e um fio de sutura de náilon 3.0 foi colocado ao redor da porção cervical da coroa do segundo molar superior esquerdo dos animais, ficando o fio supra-gengival por palatino e sub-gengival por vestibular (**Figura 7 C**). Previamente à passagem do fio, utilizou-se um guia, agulha cardiovascular Ethibond, nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado (**Figura 7 B**). Logo em seguida, passou-se o fio com calibre 3.0, de forma que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular do dente (**Figura 7 D**).



Figura – 7 (A) – Fotografia da maxila do rato wistar.

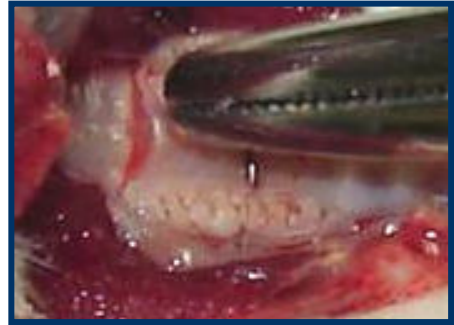


Figura – 7 (B) – Fotografia passagem da agulha-guia por mesial e distal do 2º molar superior do rato.

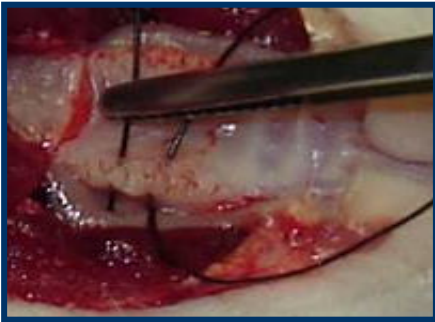


Figura – 7 (C) – Fotografia da passagem do fio de náilon em volta do 2º molar superior do rato.

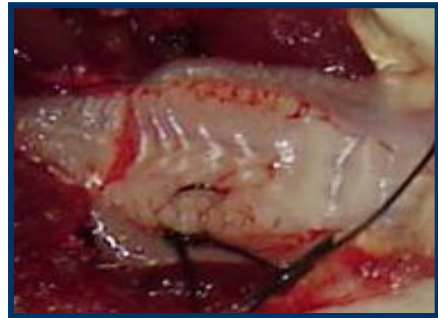


Figura – 7 (D) – Fotografia da passagem do fio de náilon em volta do 2º molar superior do rato e nó por vestibular.

4.3.2 Indução da nociceção orofacial - teste da formalina

A nociceção orofacial foi induzida em ratos por injeção s.c. de 20 µl de formalina a 1.5% na vibrissa da bochecha direita, usando uma agulha gauge 27 (CLAVELOU *et al.*, 1995) (**Figura 8**). Este volume e concentração da formalina foi selecionado com suporte em estudos-piloto que mostraram resposta comportamental bifásica relacionada à nociceção (esfregar a face), de grande intensidade no período de 0-5 minutos (primeira fase) e 10-15 minutos (segunda fase), logo em seguida à injeção na vibrissa da bochecha. A nociceção foi quantificada por meio da medida do número de segundos que o animal levou esfregando a face na área injetada com as patas dianteiras ou traseiras. Para estimar os efeitos das drogas em teste, grupos de ratos (oito em cada grupo) foram pré-tratados sistema-

ticamente com veículo (Tween 80, 3% em água destilada), com α , β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.), duas horas antes da injeção local de formalina. A morfina foi administrada (5 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes que o algógeno fosse injetado, servindo como controle positivo. Em experimentos separados, o possível envolvimento do mecanismo opióide foi avaliado na antinocicepção produzida pela α , β -amirina ou morfina, com naloxone (2 mg/kg, i.p.), um antagonista opióide, o qual foi injetado previamente.

4.3.3 Indução da nocicepção orofacial - teste da capsaicina

A nocicepção orofacial foi induzida pela capsaicina em ratos, conforme descrito anteriormente (PELLISIER; PAJOT; DALLEL, 2002). Os ratos (oito animais por grupo) receberam injeção de capsaicina (20 μ l, 1.5 μ g) subcutânea na vibrissa da bochecha direita (**Figura 8**), utilizando-se uma agulha gauge 27. A capsaicina foi dissolvida em etanol, dimetil sulfóxido e água destilada (1:1:8). Em estudos-piloto, os ratos manifestaram o comportamento relacionado à nocicepção, de esfregar a face, imediatamente após a injeção de capsaicina, e, em alta intensidade, no período compreendido entre 10-20 minutos. Deste modo, a quantificação da nocicepção foi realizada neste período, medindo-se o número de segundos que os animais levaram esfregando a área injetada com as patas dianteiras e traseiras. A α , β -amirina ou veículo foram dadas aos animais conforme descrito com o teste da formalina, 2 horas antes da injeção local de capsaicina. A morfina (5 mg/kg, s.c.), administrada 30 minutos antes do algógeno, foi incluída como controle positivo. Para testar a possibilidade do envolvimento do mecanismo opióide na produção da antinocicepção pela α , β -amirina ou morfina, os animais foram pré-tratados com o opióide antagonista, naloxone (2 mg/kg, i.p.).

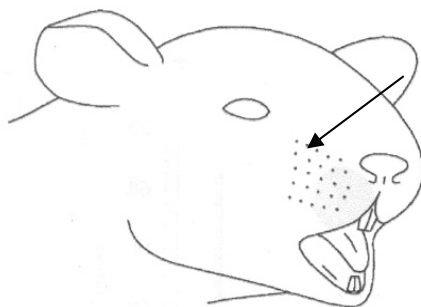


Figura 8 – Desenho do local da injeção de capsaicina e formalina na vibrissa direita do rato.

4.4 Grupos experimentais

4.4.1 Grupos experimentais da doença periodontal (DPE) - fase aguda

Grupo falso-operado

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos a passagem da agulha guia em volta dos 2º molares superiores esquerdos e receberam Tween 80, a 3%, via oral, 1 hora antes da cirurgia.

Grupo controle

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos à doença periodontal experimental e receberam Tween 80, a 3%, diluída em água destilada, via oral, 1 hora antes da cirurgia.

Grupos tratados com α , β -amirina

Os animais foram submetidos à doença periodontal experimental e subdivididos em 2 grupos de 8 animais cada um, os quais receberam α - e β -amirina nas doses de 5 e 10 mg/kg, via oral, 1 hora antes da cirurgia.

Grupo tratado com dexametasona

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos à doença periodontal experimental tratados com dexametasona na dose de 1 mg/kg, via intraperitoneal, 1 hora antes da cirurgia.

Grupo tratado com lumiracoxibe

Os animais deste grupo (n = 8) foram submetidos à doença periodontal experimental e tratados com lumiracoxibe na dose de 20 mg/kg, via oral, 1 hora antes da cirurgia.

Tabela 4 – Grupos experimentais DPE fase aguda

Grupo 1 - (falso-operado) - Passagem da agulha	Injeção de Tween 80,3% , v.o;
Grupo 2 - (controle negativo)	DPE + injeção de Tween 80,3%, v.o;
Grupo 3 - (controle positivo)	DPE + α , β -amirina 5 mg/kg , v.o;
Grupo 4 - (controle positivo)	DPE + α , β -amirina 10 mg/kg,v.o;
Grupo 5 - (controle positivo)	DPE + dexametasona 1 mg/kg,v.i.p.;
Grupo 6 - (controle positivo)	DPE + lumiracoxibe, 20 mg/kg,v.o;

4.4.2 Grupos experimentais da doença periodontal (DPE) - fase crônica

Grupo controle – doença periodontal experimental

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos à doença periodontal experimental e receberam injeção de Tween 80 a 3% via intra peritonial, 1 hora antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias. Estes animais foram subdivididos e, após o sacrifício, sendo cinco deles utilizados para análise do índice de perda óssea e três para realização da análise histopatológica do tecido gengival.

Grupo falso-operado

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos, somente, ao traspasse da agulha-guia nos espaços interproximais do 2º molar superior esquerdo, portanto, não foi passado o fio, e receberam injeção de Tween 80, a 3%, 1 hora antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias.

Grupos tratados com α , β -amirina

Os animais foram submetidos à doença periodontal experimental e subdivididos em 2 grupos, de 8 animais cada um, os quais receberam α - e β -amirina nas doses de 5 e 10 mg/kg, via intraperitonial, 1 hora antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias.

Grupo tratado com dexametasona

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos à doença periodontal experimental e tratados com dexametasona na dose de 1 mg/kg, via intraperitoneal, 1 hora antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias.

Grupo tratado com lumiracoxibe

Os animais deste grupo (n=8) foram submetidos à doença periodontal experimental e tratados com lumiracoxibe na dose de 20 mg/kg, via oral, 1 hora antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias.

Tabela 5 – Grupos experimentais DPE fase crônica

Grupo 1 - normal	Sem doença – sem tratamento
Grupo 2 - controle	DPE + injeção de Tween 80,3%, v.o;
Grupo 3 – falso-operado	Traspasse da agulha + Tween 80,3%, v.o;
Grupo 4 - (controle positivo)	DPE + α , β -amirina 5 mg/kg, v.o;
Grupo 5 - (controle positivo)	DPE + α , β -amirina 10 mg/kg, v.o.;
Grupo 6 - (controle positivo)	DPE + dexametasona 1 mg/kg, v.i.p.;
Grupo 7 - (controle positivo)	DPE + lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o;

4.5 Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental - fase aguda

4.5.1 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase (MPO), um indicador da presença de neutrófilos nos tecidos gengivais de ratos que receberam diferentes tratamentos, foi determinada de

acordo com o método descrito por (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984). As gengivas vestibulares dos molares superiores esquerdos foram removidas, pesadas e pulverizadas (50 mg) e homogeneizadas em 50 mm de fosfato tamponado (pH=6), contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras foram por três vezes congeladas (-70°C) e descongeladas (banho-maria a 37°C) com sonificação entre os ciclos, sendo, então, centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos. Alíquota do sobrenadante (0,1 ml) foi adicionada a 2,9 ml da mistura para reação contendo 0,167 mg/ml de 0-dianisidine e 0,0005% de solução de peróxido de hidrogênio, os quais foram preparados em 50 mm de tampão fosfato. Imediatamente após a adição da alíquota à mistura, a mudança na absorbância a 470 nm foi medida espectrofotometricamente após cinco minutos. Uma unidade de atividade de MPO foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água, em um minuto, em temperatura ambiente e expressa em unidade por miligrama de tecido (U/mg tecido).

4.5.2 Determinação da peroxidação lipídica – TBARS

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) (DRAPER *et al.*, 1990). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do malon dialdeído (MDA) em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, que tem absorbância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm, pH 1,0, é $1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Então, 250 μL do homogenato foram adicionados a tubos de vidro e incubados em banho-maria a 37°C por 1h, seguido por adição de 400 μL de ácido perclórico a 35% para precipitar as proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 rpm por 10 min. e 600 μL do sobrenadante foram adicionados a 200 μL de uma solução de tiobarbiturato de sódio a 1,2%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95°C por 30 min. Após resfriada, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm.

4.5.3 Determinação da concentração de TNF- α

A dosagem de TNF- α foi realizada, no plasma dos animais, usando o *kit* comercial Tumor Necrosis Factor Alpha, Biotrak ELISA (Amersham, UK). O método de ensaio é baseado em ELISA de fase sólida, que utiliza um anticorpo para TNF- α ligado a poços em uma placa de 96 poços junto com um anticorpo biotilado para mTNF- α e uma estreptavagina conjugada a uma peroxidase. O TNF- α foi medido em uma faixa de 50-2450 pg/ml usando o protocolo do *kit*.

4.6 Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental - fase crônica

4.6.1 Variação da massa corpórea

Todos os animais foram pesados em dias alternados durante os onze dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

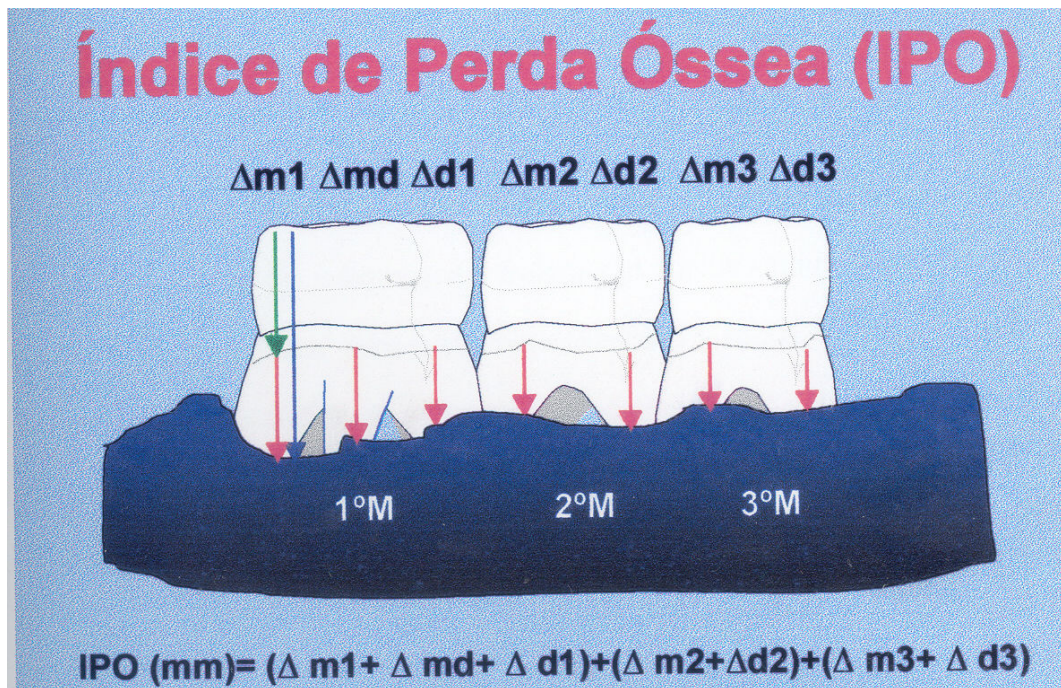
4.6.2 Estudo morfométrico do tecido ósseo na doença periodontal experimental

A estrutura óssea alveolar observada na doença periodontal experimental foi estudada sob as análises morfométrica e histopatológica. As hemiarcadas contralaterais, sem doença periodontal experimental, foram utilizadas como controle.

No 11º dia após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, colocadas em álcool etílico a 70% e, posteriormente, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1 %, com o objetivo de discriminar o tecido ósseo dos dentes, os quais sofrem coloração em menor intensidade. Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas para posterior mensuração por meio de fotografias, utilizando máquina fotográfica digital SONY - DSC H1 (aumento de 1,5x). Para esta análise, fez-se uso do *software Image J*®.

As medidas foram feitas em sete pontos diferentes, em cada hemiarcada, nas faces vestibulares dos dentes molares: três no primeiro molar, visto que este dente possui três raízes, denominadas mesial (m1), média (md) e distal (d1); dois pontos no segundo molar (m2 e d2) e terceiro molar (m3 e d3), respectivamente (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH, 1978). As medidas foram efetuadas no longo eixo dos dentes, considerando a distância entre ponta da cúspide e a margem ossea alveolar.

As diferenças ou variações (Δ) foram obtidas como resultado das medidas das hemiarcadas com DPE, subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contralaterais (controle) (SAMEJIMA; EBISU; OKADA, 1990). A soma das sete variações, correspondendo ao índice de perda óssea (IPO), foi expressa em mm (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH; 1978) (**Figura 3**).



(Figura adaptada de LIMA, 1999).

Figura 9 – Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea

As diferenças (setas vermelhas, Δ) foram obtidas das medidas feitas nas hemiarcadas com DPE (seta azul), subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contralaterais (seta verde, controle). A soma das sete variações correspondeu ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm.

4.6.3 Análise histopatológica do osso alveolar

No 11º dia após inserção da ligadura para indução da DPE, os animais foram sacrificados, tiveram suas maxilas removidas, fixadas em formol a 10% por 24 horas e, em seguida, colocadas em álcool etílico a 70%, sendo, posteriormente, imersas em solução de ácido nítrico a 5%, tendo sido esta solução trocada a cada 24 – 48 horas por, aproximadamente, dez dias, até que a desmineralização fosse efetivada. O acompanhamento da descalcificação foi realizado com o auxílio de uma agulha hipodérmica, mediante a qual o nível de resistência dos tecidos à introdução da agulha foi analisado.

Em etapa posterior, as arcadas foram lavadas em água corrente e imersas em uma solução de sulfato de sódio a 5% para evitar o edema do conjuntivo, permanecendo assim por um período de 24 horas. Em seguida, as maxilas foram lavadas em água corrente por 24 horas e foram objeto de imersão em solução etílica a 70%. A inclusão em parafina foi realizada para, finalmente, receber cortes seriados (5 µm) em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Para a análise microscópica da hemiarcada, a região entre os 1º e 2º molares foi considerada, sendo avaliados os aspectos inflamatórios, como presença/intensidade de infiltrado celular e de osteoclastos, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento. Tais achados foram classificados e padronizados no Laboratório da Inflamação e do Câncer-LAFICA / UFC (LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2004) como delineado a seguir:

SCORE 0 – infiltrado celular ausente ou discreto; escassos / raros osteoclastos de permeio; processo alveolar preservado; cimento preservado;

SCORE 1 – infiltrado celular moderado; presença de osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado;

SCORE 2 – infiltrado celular acentuado; presença de grandes quantidades de osteoclastos; processo alveolar em digestão acentuada; destruição parcial do cimento; e

SCORE 3 – infiltrado celular acentuado; processo alveolar ausente; destruição acentuada do cimento.

4.6.4 Análise histopatológica do tecido gengival

As amostras dos tecidos gengivais da face vestibular dos dentes foram removidas quando do ato de sacrifício dos animais e fixadas por 12 horas em formol a 10%, colocadas em álcool metílico, antes de serem processadas para a coloração pelo método HE. Neste caso, os estudos histopatológicos foram realizados para a análise do infiltrado celular predominante. Para a análise microscópica da gengiva, foram analisados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular e edema como mencionado na seqüência.

SCORE 0 – tecido epitelial e conjuntivo normais;

SCORE 1 – edema ausente e discreto infiltrado celular às custas principalmente de eosinófilos; e

SCORE 2 – presença de edema com infiltrado celular inflamatório com predomínio de mononucleares e eosinófilos.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM, e avaliados por análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls para comparações entre grupos individuais.

Nas análises histopatológicas das gengivas e das maxilas, os dados obtidos foram expressos como mediana e os testes estatísticos aplicados foram os de Kruskal-Wallis e de Dunn. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Este estudo procurou verificar o potencial antiinflamatório de um triterpeno natural, α - β -amirina em um modelo de DPE em seu estágio agudo e crônico, induzida por ligadura em ratos, bem como seu efeito antinociceptivo em modelo de nocicepção orofacial induzida por formalina e/ou capsaicina em ratos.

5.1 Efeito do α - β -amirina em modelo da doença periodontal – fase aguda

O efeito antiinflamatório da α – β -amirina nesta fase de estudo foi avaliado por meio da dosagem dos níveis de TNF- α no plasma, seis horas após a indução da doença, e vinte e quatro horas depois, por meio da atividade da mieloperoxidase (MPO), um índice do influxo de neutrófilos, e da formação de TBARS.

5.1.1 Efeito do α - β -amirina sobre os níveis de TNF- α em animais submetidos à doença periodontal experimental

Para avaliar o possível papel do TNF- α no desenvolvimento da periodontite induzida por ligadura, foi realizado o ensaio imunoenzimático, seguindo o protocolo do teste ELISA para registrar os níveis de TNF- α no plasma. Os resultados mostraram elevação significativa desta citocina no plasma nos grupos com a doença periodontal experimental, quando comparados com o controle falso-operado (**Figura 10**). Dentre os grupos tratados, aqueles que receberam α , β -amirina (5 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg, i.p.) apresentaram reduções significativas nos níveis de TNF- α no plasma, o que não ocorreu com os grupos tratados com α , β -amirina (10 mg/kg) e com o grupo tratado com lumiracoxibe 20 mg/kg.

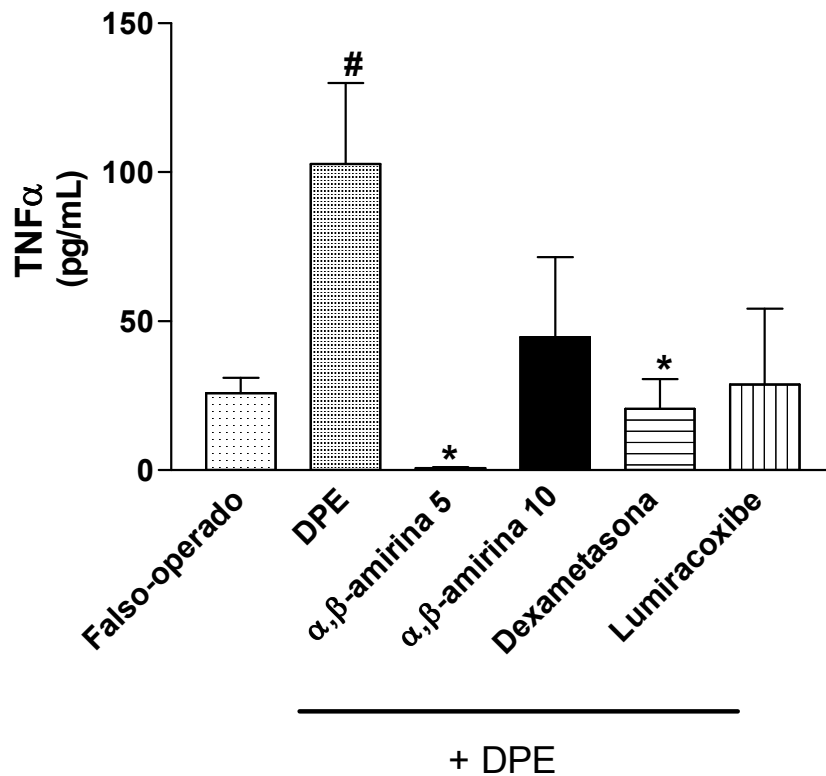


Figura 10 – Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre os níveis de TNF- α no plasma na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental (veículo, Tween 80 a 3 %, 10 ml/kg, v.o.), α , β -amirina (5 e 10 mg/kg, v.o.), dexametasona (1 mg/kg, i.p.) ou lumiracoxibe (20 mg/kg, v.o.). As drogas foram administradas duas horas antes da indução da periodontite. O grupo-controle (falso-operado) não foi tratado. Amostras sanguíneas foram coletadas seis horas seguindo-se a colocação da ligadura e realizada a análise de TNF- α no plasma. As barras representam média \pm E.P.M. nos níveis de TNF- α no plasma. # $p < 0,05$ vs. falso operado; * $p < 0,05$ vs. DPE (ANOVA seguindo-se pelo teste de Student Newman-Keuls).

5.1.2 Efeito do α - β -amirina sobre a atividade de mieloperoxidase em tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal experimental

Nas 24 horas após a colocação da ligadura, a atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival do grupo submetido à doença periodontal experimental foi significativamente aumentada quando comparada ao grupo-controle falso-operado (**Figura 11**), possivelmente em decorrência do influxo aumentado de neutrófilos.

Nos animais pré-tratados com o α , β -amirina 5 e 10 mg/kg ou com dexametasona 1 mg/kg, a atividade de MPO mostrou-se significativamente baixa, quando comparada a

doença periodontal experimental, não sendo, no entanto, diferente dos valores obtidos do grupo-controle falso-operado. Apesar do lumiracoxibe mostrar uma tendência para inibir a atividade de MPO, seu efeito não foi estatisticamente diferente do grupo doença periodontal experimental.

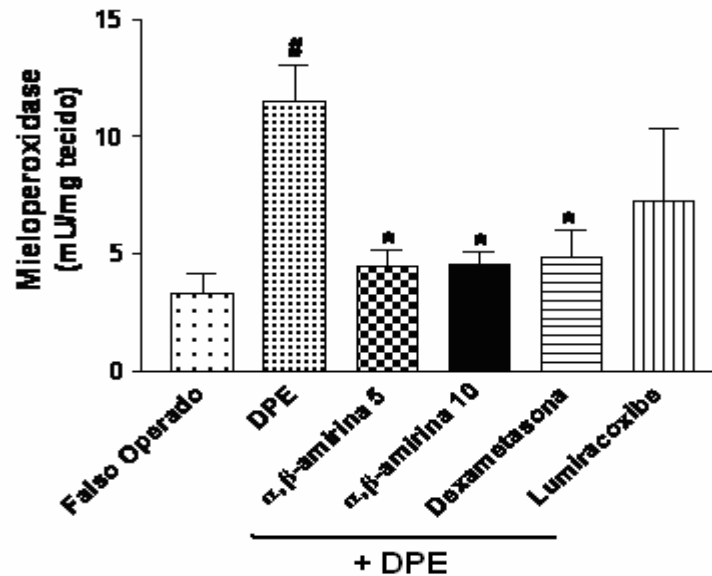


Figura 11 – Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe na atividade gengival da mieloperoxidase na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental (veículo, Tween 80 a 3 %, 10 ml/kg, v.o.), α , β -amirina (5 e 10 mg/kg, v.o.), dexametasona (1 mg/kg, i.p.) ou lumiracoxibe (20 mg/kg, v.o.) foram administrados duas horas antes da indução da periodontite. O grupo falso-operado não foi tratado. O tecido gengival foi coletado 24 horas após a ligadura e analisado para mieloperoxidase. As barras representam média \pm E.P.M. na atividade gengival da mieloperoxidase. # $p < 0,05$ vs. falso-operado, sendo considerado significativamente diferente quando comparado ao falso-operado. * $p < 0,05$ vs. DPE (ANOVA seguindo-se pelo teste de Student Newman-Keuls).

5.1.3 Efeito do α - β -amirina sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal experimental

Mediante a avaliação deste parâmetro, constatou-se que os grupos tratados com α , β -amirina nas concentrações de 5 e 10 mg/kg, bem como o grupo tratado com dexametasona na concentração de 1mg/kg, tiveram decréscimo significativo na formação de TBARS, quando

comparados com o grupo não tratado doença periodontal experimental. Já o grupo tratado com lumiracoxibe não apresentou diminuição significativa nestas taxas (**Figura 12**).

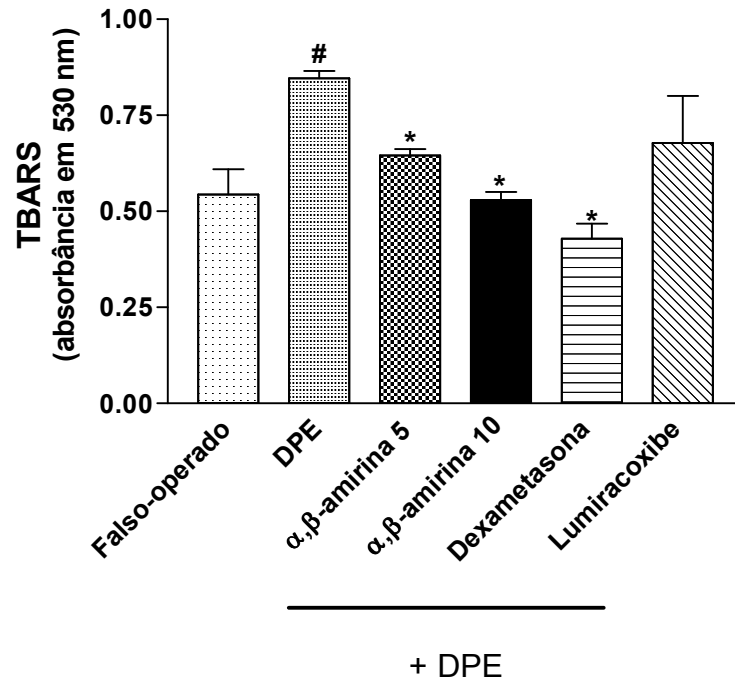


Figura 12 – Efeitos do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre os níveis de TBARS gengival na fase aguda da DPE - doença periodontal experimental (veículo, Tween 80 a 3 %, 10 ml/kg, v.o.), α , β -amirina (5 e 10 mg/kg, v.o.), dexametasona (1 mg/kg, i.p.) ou lumiracoxibe (20 mg/kg, v.o.). As drogas foram administradas duas horas antes da indução da DPE. O grupo-controle falso-operado não foi tratado. O tecido gengival foi coletado 24 horas após a ligadura e analisado para substâncias tiobarbitúricas ácidos resistentes (TBARS). As barras representam média \pm E.P.M. nos níveis de TBARS gengival. # $p < 0,05$ vs. falso operado; * $p < 0,05$ vs. DPE (ANOVA seguindo-se pelo teste de Student Newman-Keuls).

5.2 Efeito do α - β -amirina em modelo de doença periodontal - fase crônica

5.2.1 Efeito do α - β -amirina sobre a variação de massa corpórea de animais submetidos à doença periodontal experimental

A Figura 13 mostra que, ao final dos 11 dias de experimento, os animais dos grupos falso-operado, doença periodontal experimental, α , β -amirina 5 e 10 mg/kg e

lumiracoxibe, tiveram um ganho ponderal de massa corpórea menor quando comparados com o grupo normal. Observa-se, ainda, que neste período o grupo tratado com dexametasona perdeu peso.

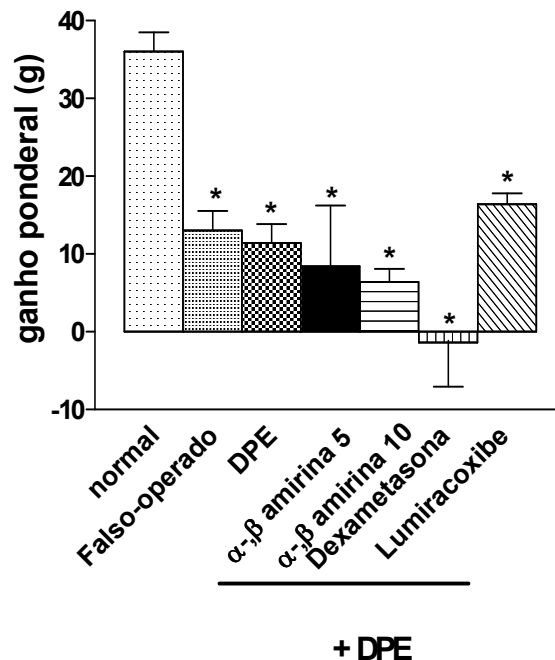


Figura 13 – Efeito do α , β -amirina (5mg/kg, 10 mg/kg), dexametasona e lumiracoxibe sobre o ganho ponderal de massa corpórea em animais submetidos à DPE - doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos. As barras representam média \pm E.P.M do ganho ponderal (g) após 11 dias da indução da DPE. *vs normal ($p < 0,05$, ANOVA e teste de Student Newman-Keuls)

5.2.2 Efeito do α - β -amirina sobre o índice de perda óssea (IPO) em maxilas retiradas de animais submetidos à doença periodontal experimental

Os animais que receberam somente veículo (doença periodontal experimental) apresentaram significativa reabsorção óssea em relação aos animais falso-operados cujo índice de perda óssea foi próximo a zero, mostrando que o método de indução da doença foi efetivo. Observou-se, no entanto, (**Figura 14**) que nenhum tratamento proposto (α , β -amirina 5 e 10 mg/kg, dexametasona 1 mg/kg e lumiracoxibe 20 mg/kg) foi capaz de reduzir o índice de perda óssea quando comparado com o grupo doença periodontal experimental que não recebeu nenhum tipo de tratamento.

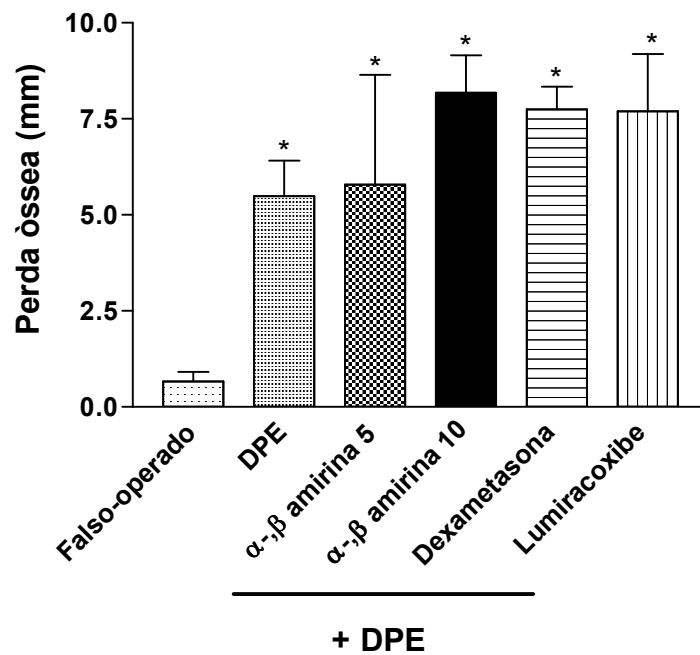


Figura 14 – Efeito do α , β -amirina (5 mg/kg, 10 mg/kg), dexametasona e lumiracoxibe sobre o índice de perda óssea (IPO) na doença periodontal experimental induzida por ligadura em ratos. As barras representam média \pm E.P.M do índice de perda óssea (mm). *vs FO ($p < 0,01$, ANOVA e teste de Student Newman-Keuls).

5.2.3 Aspecto macroscópico do efeito do α - β -amirina na doença periodontal experimental induzida por ligadura

Observou-se, quando da avaliação morfométrica da hemiarcada superior esquerda dos animais submetidos à doença periodontal experimental, que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal experimentalmente, quando comparada com sua hemiarcada contralateral, utilizada como controle. O modelo foi capaz de reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, tais como: reabsorção óssea alveolar e perda de contato interdental (**Figura 15 B**) em comparação aos animais normais, não submetidos a cirurgia (**Figura 15 A**). O grupo falso-operado (**Figura 15 C**) mostra discreta reabsorção óssea, sem exposição de raiz e sem perda de contato interdental.



Figura 15 (A)



Figura 15 (B)



Figura 15 (C)



Figura 15 (D)



Figura 15 (E)



Figura 15 (F)



Figura 15 (G)

Figura 15 – Aspecto macroscópico de maxilas dissecadas de ratos: normal (A), doença periodontal experimental (B), falso-operado (C), α - e β -amirina 5 mg/kg, i.p. (D), α - e β -amirina 10 mg/kg, i.p. (E), lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o. (F) dexametasona 1 mg/kg, i.p. (G).

A **figura 15** (D, E, F, G) refere-se a imagem do periodonto e que foi tratado, respectivamente, com α , β -amirina 5 mg/kg,i.p., α , β -amirina 10 mg/kg,i.p., lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o. e dexametasona, 1 mg/kg,i.p., observando-se destruição do osso alveolar, exposição das raízes e perda de contato interdental.

5.2.4 Aspecto das alterações histopatológicas do efeito do α - β -amirina na maxila de ratos submetidos à doença periodontal experimental

A **figura 16** mostra as fotomicrografias de periodonto de rato normal (**figura 16 A**) e, portanto, não submetido à doença periodontal experimental, onde foi possível observar infiltrado celular discreto, escassos osteoclastos, processo alveolar preservado e cimento preservado, e que foi escoreado 0(0,0); periodonto de rato falso-operado (**figura 16 B**), observando-se infiltrado celular discreto, escassos osteoclastos e processo alveolar preservado, escore 0(0,0); e doença periodontal experimental (DPE) (**figura 16 C**), observando-se infiltrado celular acentuado, processo alveolar ausente e destruição acentuada do cimento, escore 3(3,3).

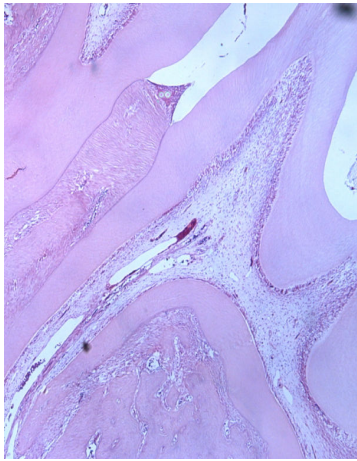


Figura 16 (A)

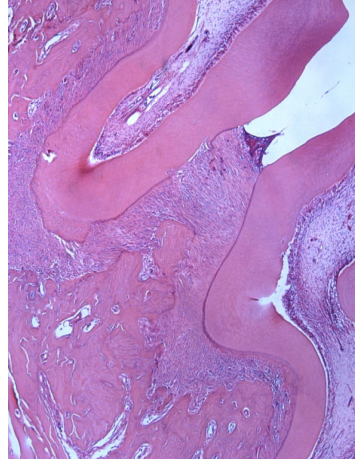


Figura 16 (B)

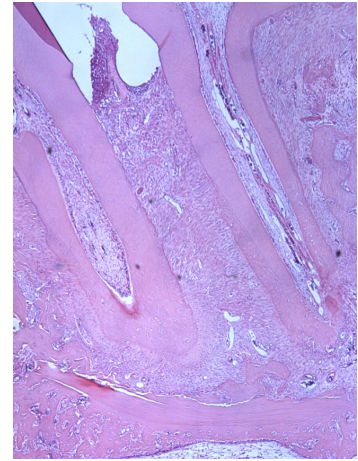


Figura 16 (C)

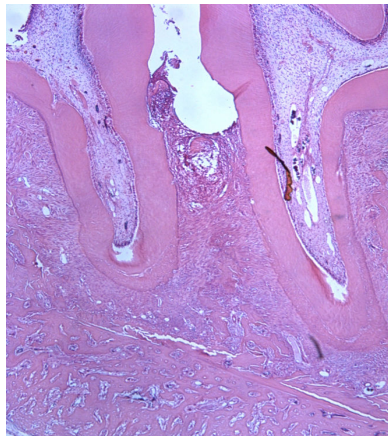


Figura 16 (D)

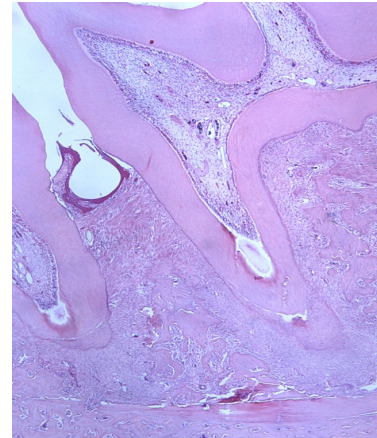


Figura 16 (E)

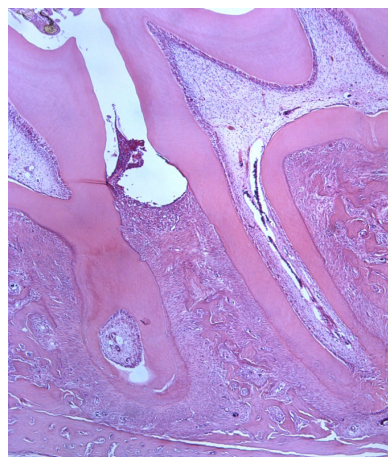


Figura 16 (F)

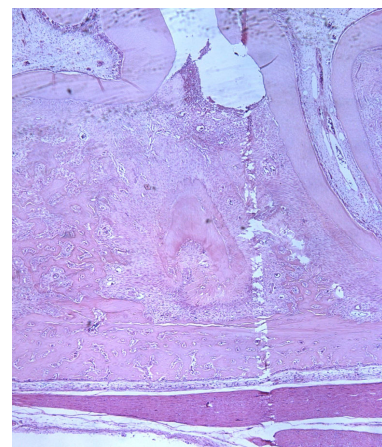


Figura 16 (G)

Figura 16 – Fotomicrografias de periodonto de rato normal (A), rato falso-operado (B) e rato submetido à DPE (C) e de animais submetidos à DPE tratados com α , β -amirina 5 mg/kg, i.p. (D), α , β -amirina 10 mg/kg, i.p. (E), lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o. (F) e dexametasona 1 mg/kg,i.p. (G).

A série da **figura 16** refere-se à fotomicrografia do periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental, tratados com α e β -amirina 5 mg/kg.i.p (**figura 16 D**), podendo-se observar infiltrado celular acentuado, presença de grande número de osteoclastos, processo alveolar em digestão acentuada e destruição parcial do cimento, que recebeu o escore 2(2-2). Nos animais tratados com α - e β -amirina 10 mg/kg (**figura 16 E**), foram observados infiltrado celular moderado, presença de alguns osteoclastos, pequena reabsorção do processo alveolar e cimento preservado, escore 1,5(1-2). Nos animais tratados com lumiracoxibe 20 mg/kg., v.o. (**figura 16 F**), foram vistos infiltrado celular moderado, presença de alguns osteoclastos, pequena reabsorção do processo alveolar, cimento preservado, tendo o escore 1(1,1); e, no grupo dexametasona 1 mg/kg,i.p (**figura 16 G**), vêem-se infiltrado celular moderado, presença de alguns osteoclastos, pequena reabsorção do processo alveolar e cimento preservado; recebeu o escore (1(1,1)).

Tabela 6 – Efeito do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre as alterações nas maxilas observadas na doença periodontal experimental em ratos.

Grupo	Escores histopatológicos
Normal	0(0,0)
Falso operado	0(0,0)
DPE	3(3,3) ^b (vs normal), ^b (vs fo)
α , β 5 mg/kg + DPE	2(2,2) ^a (vs fo)
α , β 10 mg/kg + DPE	1,5(1,2)
Lumiracoxibe 20 mg/kg + DPE	1(1,1)
Dexametasona 1 mg/kg + DPE	1(1,1)

Ao se aplicar o teste de Kruskall-Wallis, encontrou-se diferença estatisticamente significante entre os sete grupos quanto à tendência central dos dados ($p=0,0004$).

Utilizando-se o teste de Dunn, detectou-se significância estatística entre os grupos: normal e operado (b) ($p < 0,01$), falso-operado e operado ($p < 0,01$) e falso-operado e α , β -amirina 5 mg/kg (a) ($p < 0,05$). a) α , β 5 mg/kg b) DPE.

5.2.5 Aspecto das alterações histopatológicas do efeito do α - β -amirina em tecidos gengivais de ratos submetidos à doença periodontal experimental

A série da **figura 17** refere-se à fotomicrografia da gengiva de animais do grupo normal (**figura 17 A**). Observou-se tecido epitelial e conjuntivo normal, escoreado como 0(0,0). No grupo falso-operado (**figura 17 B**), foi possível observar os mesmos aspectos histopatológicos do grupo normal, tendo este corte sido escoreado como 0(0,0). Na doença periodontal experimental (C), observou-se presença de edema com infiltrado celular inflamatório, com predomínio de mononucleares e eosinófilos, escoreada como 2(2,2).

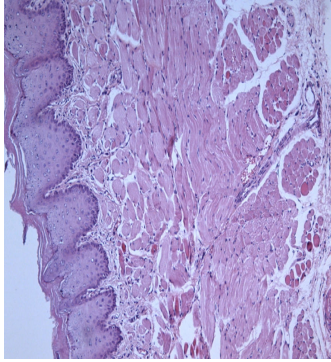


Figura 17 (A)

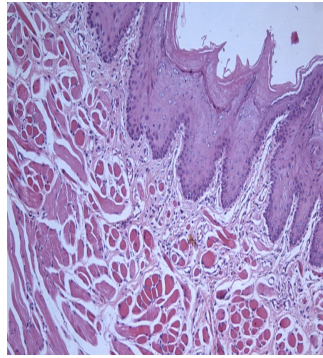


Figura 17 (B)

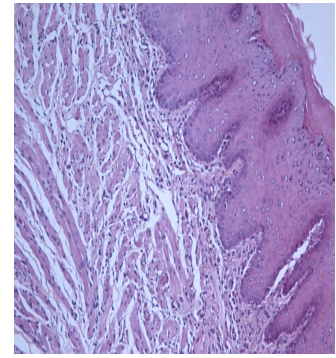


Figura 17 (C)

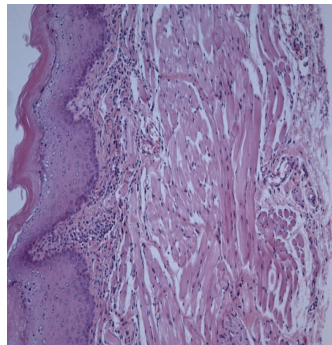


Figura 17 (D)

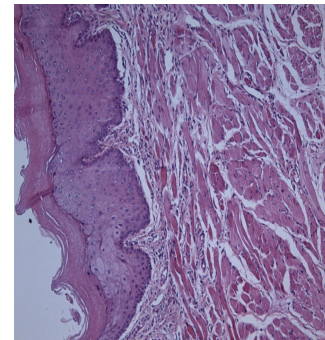


Figura 17 (E)

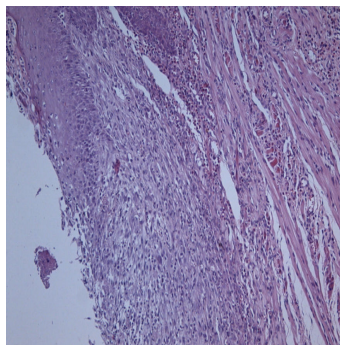


Figura 17 (F)

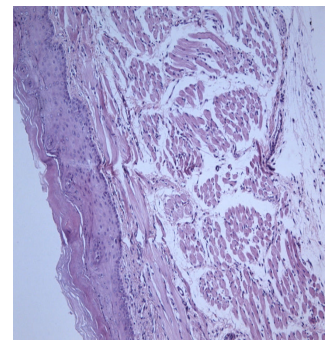


Figura 17 (G)

Figura 17 – Fotomicrografias de gengivas de rato normal (A), rato falso-operado (B) e rato submetido à DPE (C) e de ratos: a DPE tratados com α , β -amirina 5 mg/kg, i.p. (D), α , β -amirina 10 mg/kg, i.p. (E), lumiracoxibe 20 mg/kg, v.o. (F) e dexametasona 1 mg/kg, i.p (G).

A série da **figura 17** refere-se à fotomicrografias de gengiva de rato do grupo operado e que foi tratado com α , β -amirina 5 mg/kg (**figura 17 D**), onde se observaram algumas áreas de infiltrado inflamatório e edema e escoreada como 1,5(1,2); rato operado e

tratado com α , β -amirina 10 mg/kg (**figura 17 E**), onde também foram vistas algumas áreas com edema e infiltrado inflamatório, sendo escoreada, também, como 1,5(1,2); rato operado e tratado com lumiracoxibe 20 mg/kg (**figura 17 F**), notando-se áreas com presença de edema, infiltrado inflamatório com predominância de mononucleares e eosinófilos, sendo escoreada como 2(2,0); e rato operado e tratado com dexametasona 1 mg/kg (**figura 17 G**), constatando-se a presença de edema e com infiltrado inflamatório, sendo escoreada como 2(2,0).

As **tabelas 6 e 7** mostram, respectivamente, os escores histopatológicos obtidos nas amostras das maxilas e gengivais de ratos normais e de ratos falso-operados, como também daqueles submetidos à doença periodontal experimental e tratados com α , β -amirina 5 e 10 mg/kg, lumiracoxibe 20 mg/kg e dexametasona 1 mg/kg. pelo período de 11 dias.

Tabela 7 – Efeito do α , β -amirina, dexametasona e lumiracoxibe sobre as alterações gengivais observadas na doença periodontal experimental em ratos.

Grupo	Escores histopatológicos
Normal	0(0,0)
Falso operado	0(0,0)
DPE	2(2,2)
α , β 5 mg/kg + DPE	1,5(1,2)
α , β 10 mg/kg + DPE	1,5(1,2)
Lumiracoxibe 20 mg/kg + DPE	2(2,0)
Dexametasona 1 mg/kg + DPE	2(2,0)

Na análise estatística, ao se aplicar o teste de Kruskal-Wallis, encontrou-se diferença estatisticamente significante entre os sete grupos quanto à tendência central dos

dados ($p < 0,021$). Ao se empregar, porém, o teste de Dunn, não se detectou significância em nenhum par de grupos ($p > 0,05$).

5.2.6 Efeito do α - β -amirina em modelo de nociceção orofacial induzida por formalina e capsaicina

Os resultados mostram que o pré-tratamento com α , β -amirina produziu pronunciada antinociceção, como evidenciada pela diminuição do comportamento de esfregar a face na segunda fase no teste com a formalina (**figura 18 A e B**) e com a capsaicina (**figura 19**).

Observou-se que a α , β -amirina foi incapaz de reduzir o tempo que o animal gastou esfregando a face na primeira fase do teste com formalina, enquanto a segunda fase foi inibida (**figura 18 A**).

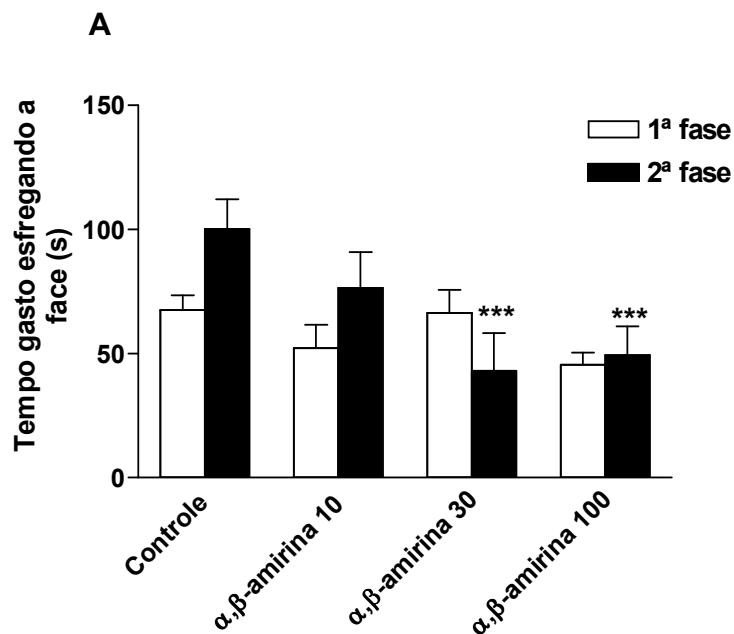


Figura 18 A – Efeito do α , β -amirina sobre a nociceção orofacial induzida por formalina em ratos (A). Veículo ou α , β -amirina foram administradas duas horas antes da injeção de formalina na vibrissa. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 8 animais. *** $p < 0,001$ comparado ao controle.

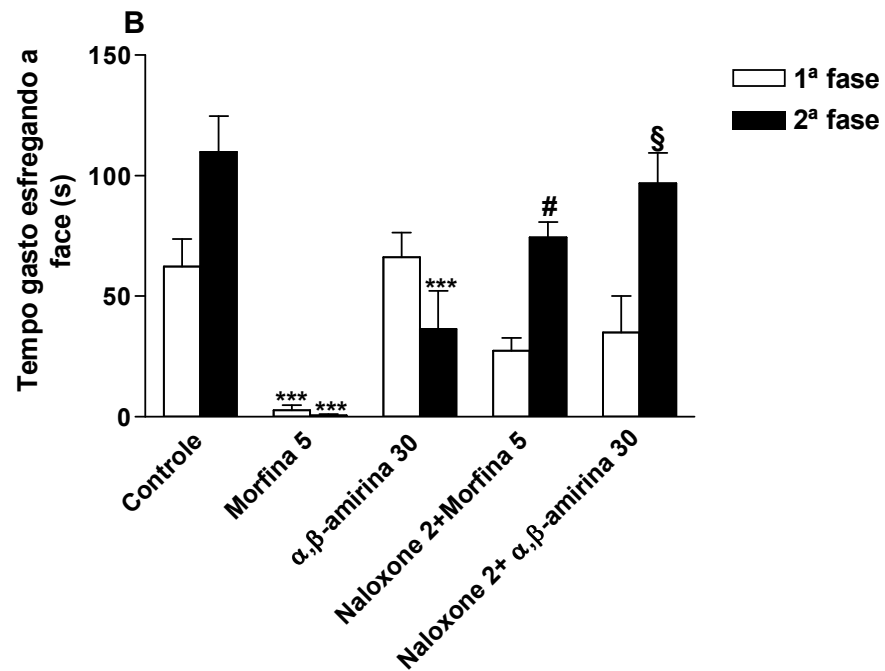


Figura 18 B – O efeito do α , β -amirina no pré-tratamento com morfina e/ou naloxone sobre o efeito antinociceptivo do α , β -amirina (B). Morfina ou naloxone foram injetados 30 minutos antes da formalina. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de oito animais. # $p < 0,01$ comparado à morfina e \$ $p < 0,01$ comparado com α , β -amirina (ANOVA seguindo-se por teste de Student Newman-Keuls).

A α , β -amirina inibiu a nociceção neurogênica induzida pela injeção de capsaicina na vibrissa, conforme evidenciado pela supressão da resposta de esfregar a face (**figura 19**), reversível ao naloxone. O naloxone, um antagonista opióide, foi capaz de antagonizar o efeito antinociceptivo da α , β -amirina.

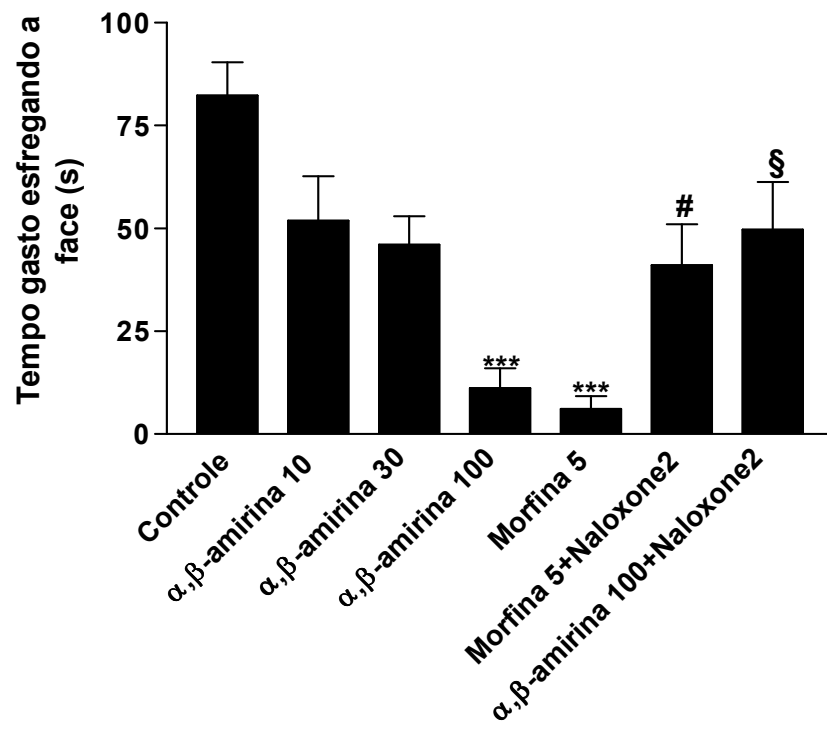


Figura 19 – Efeito do α , β -amirina sobre a nociceção orofacial induzida por capsaicina em ratos. Veículo ou α , β -amirina foram administrados duas horas antes da capsaicina na vibrissa da bochecha enquanto morfina e ou naloxone foram injetados 30 minutos antes da capsaicina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de oito animais. *** $p < 0,001$ comparado ao controle. # $p < 0,01$ comparado com morfina sozinha e § $p < 0,01$ comparado com α , β -amirina. (ANOVA seguindo-se por teste de Student Newman – Keuls).

6 DISCUSSÃO

Várias plantas são utilizadas na prática popular para manutenção da saúde bucal (NOSKOV, 1966; DAROUT; ALBANDER; SKAUG, 2000; SASTRAVAHA *et al.*, 2005) e o uso de extratos de ervas como enxaguatório bucal não é incomum (PISTORIUS *et al.*, 2003; BOTELHO *et al.*, 2007). *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., comumente conhecida como almécega, é uma planta amplamente distribuída na Amazônia e Nordeste do Brasil. A resina coletada do seu tronco é um efetivo agente cicatrizador, dotado de propriedades antiinflamatórias e analgésicas (SIANI *et al.*, 1999).

O principal componente da resina é o triterpeno pentacíclico α , β -amirina (uma mistura isomérica), e estudos prévios, tendo sido alguns destes desenvolvidos em laboratório da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, descrevem-na como possuidora de atividades antimicrobianas (KATERERE *et al.*, 2003), gastroprotetoras (OLIVEIRA *et al.*, 2004), antinociceptivas (OLIVEIRA *et al.*, 2004; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2006), antiinflamatórias (OLIVEIRA *et al.*, 2005), ansiolítica e antidepressiva (ARAGÃO *et al.*, 2006).

Baseando-se nestes achados, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial antiinflamatório de uma substância natural, o triterpeno pentacíclico α , β -amirina, em doença periodontal experimental e seu desempenho no combate a dor orofacial.

A doença periodontal é uma enfermidade inflamatória / imunológica crônica que se estabelece em resposta a antígenos periodontopatogênicos e parece ser decisiva no sentido de proteger contra infecção. Assim sendo, a doença periodontal é descrita como uma patologia de natureza multifatorial, resultado de uma interação complexa entre microorganismos patogênicos e defesa do hospedeiro, cujo desenvolvimento pode ser modificado por fatores locais (fumo), condições adquiridas (doenças sistêmicas) ou fatores genéticos (GENCO; 1992; PAGE; KORNMAN, 1997; KINANE, PETERSON, STATHOPOULOU, 2006).

Na etiopatogenia da doença periodontal, a presença do biofilme dental na região de sulco/bolsa periodontal é essencial para a sua progressão, levando ao estabelecimento e perpetuação dos fenômenos inflamatórios nos tecidos periodontais adjacentes. A presença, no entanto, somente das bactérias não é suficiente para esclarecer tais mecanismos fisiopatológicos da destruição tecidual. A resposta do hospedeiro também desempenha papel fundamental na patogênese da doença por meio da liberação de mediadores inflamatórios nos tecidos em decorrência da interação celular com os microorganismos e os produtos bacterianos (PAGE; KORNMAN, 1997).

Nas células imunes, os produtos bacterianos induzem a produção de fatores locais como IL-1 α e β , IL-6, PGE2, e fator de necrose tumoral (TNF- α), bem como outros mediadores inflamatórios. Todos esses mediadores modificam o balanço da remodelação óssea no hospedeiro, tanto aumentando a formação e ativação osteoclástica, bem como inibindo a função osteoblástica, o que, conseqüentemente, leva à destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (SCHWARTS *et al.*, 1997). Desta forma, o hospedeiro apresenta tanto uma ação protetora como destrutiva sobre os tecidos periodontais (KINANE; LINDHE, 1999).

A inabilidade de se examinar a iniciação e a progressão da doença periodontal, e de se avaliar certas terapias em humanos, cria um grande interesse na utilização de modelos animais em pesquisas no campo da Periodontia. Para o estudo da doença periodontal, camundongos (LOHINAI *et al.*, 2003), ratos (NASSAR *et al.*, 2004), cachorros, (SHIBLI *et al.*, 2003) e alguns primatas (OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002) são freqüentemente utilizados. A vasta utilização de roedores neste tipo de pesquisa atesta a utilidade destes animais. São óbvias as vantagens como tamanho, custo, facilidade de manuseio, criação e alojamento. Além disso, a utilização destes animais é previsível no sentido de reproduzir a doença com alto grau de confiabilidade (JORDAN, 1971), embora já tenham sido descritos na literatura diferenças quanto à reprodução desta doença em roedores, pois, nestes, a perda óssea tende a ser interproximal, enquanto em humanos ocorre ao longo da superfície radicular (WEINBERG; BRAL, 1999).

A indução de doença periodontal em animais é possibilitada pela manipulação na dieta (ROBINSON; HART; PIGOTT, 1991); introdução de microorganismos patogênicos (LPS) (DUMITRESCU *et al.*, 2004); por injeção de toxinas bacterianas (KLAUSEN, 1991;

LLAVANERAS *et al.*, 1999) ou por colocação de ligaduras em volta dos molares superiores (KLAUSEN, 1991; BEZERRA *et al.*, 2001; LEITÃO, 2002; HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; GURGEL *et al.*, 2003; Di PAOLA *et al.*, 2005; AZOUBEL *et al.*, 2007).

Nyman; Schoroder; Lindhe, 1979 foram pioneiros no estudo do emprego de antiinflamatórios não esteroidais em modelo de periodontite experimental em cães. Com a utilização de indometacina, os resultados mostraram uma diminuição da progressão da doença periodontal com redução da inflamação e da perda óssea alveolar. Estudos sucessivos em modelos animais utilizando outras drogas, como o flurbiprofeno (JEFFCOAT *et al.*, 1986, OFFENBACHER *et al.*, 1992), o ibuprofeno (WILLIAMS *et al.*, 1988; OFFENBACHER *et al.*, 1992), o cetoprofeno (LI *et al.*, 1996), entre outros, também confirmaram os efeitos positivos deste agente farmacológico na diminuição de progresso da doença periodontal, sejam em modelos de periodontite experimental ou ocorrendo naturalmente.

Além da atividade antiinflamatória, a supressão da reabsorção óssea são questões importantes no tratamento da periodontite. Neste contexto, triterpenos derivados de *Cimicifugae rhizoma*, uma nova classe de inibidores de reabsorção óssea e perda óssea induzida por ovariectomia, tiveram seus efeitos pesquisados por Li *et al.* (2007), pois pesquisas prévias sugeriam que estes compostos poderiam possuir efeito protetor contra a osteoporose. Após obtenção dos resultados, concluíram que estes triterpenos exerceram efeitos inibitórios sobre a reabsorção óssea osteoclástica por meio da supressão tanto da formação de osteoclastos quanto sua atividade reabsortiva, mostrando, também, efeito protetor significativo na densidade mineral óssea em camundongos ovariectomizados.

Sendo um triterpeno pentacíclico, foi esperado que α , β -amirina pudesse ser um agente antiinflamatório ideal para paralisar a progressão da doença periodontal do seu estágio agudo para o crônico e na prevenção da perda óssea.

Supondo-se que a doença periodontal experimental (DPE) induzida por ligadura é uma doença imuno/inflamatória, e de que esta pode ser subdividida em dois estádios, agudo e crônico, o efeito das drogas testadas foi avaliado nestes dois, já que os mecanismos que as caracterizam são distintos.

Na fase aguda da DPE, os parâmetros avaliados foram os níveis de TNF- α , a atividade da mieloperoxidase e peroxidação lipídica. Muitas (mas não todas) propriedades biológicas do TNF- α coincidem com as do IL-1. Ambas estimulam a reabsorção óssea pela indução de proliferação de células progenitoras de osteoclastos e, indiretamente, pelo estímulo da atividade de osteoclastos maduros (MANOLAGAS, 1995). Dentre os grupos tratados, aqueles que receberam α , β -amirina 5 mg/kg e dexametasona mostraram significativa redução nos níveis de TNF- α . Estas observações estão de acordo com os achados recentes sobre o etanercept, um antagonista do fator de necrose tumoral com efeitos antiinflamatórios, que mostrou grau reduzido de periodontite desenvolvida por injúria tecidual (Di PAOLA *et al.*, 2007). Estes achados sugerem que α , β -amirina deve atuar agindo como um agente antiinflamatório, mediante a supressão da liberação do TNF- α , ou de sua ação pró-inflamatória. No trabalho de Di Paola *et al.* (2007), entretanto, o etanercept foi usado como pós-tratamento (i.e. após colocação de ligadura) para mostrar uma resposta terapêutica, enquanto no presente estudo, as drogas em teste foram administradas como um pré-tratamento, isto é, administrado em animais antes da colocação da ligadura, com o objetivo de verificar se a α , β -amirina modificaria ou não a fase da inflamação aguda na periodontite experimental. No grupo tratado com lumiracoxibe, um antagonista da COX-2, não houve uma redução significativa nos níveis de TNF- α , o que contrasta com vários estudos que fornecem evidências de que a terapia sistêmica com inibidores COX-2, tais como o meloxicam e etorocoxib, podem retardar a progressão da periodontite induzida experimentalmente em ratos durante o período experimental inicial, e também retardar a reabsorção do osso em um estágio posterior (HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; NASSAR *et al.*, 2005). Talvez, este achado indique que inibidores COX-2 não influenciam a diminuição da perda óssea pela diminuição dos níveis do TNF- α , mas sim por meio de outros mecanismos.

Nesta investigação foi possível verificar que houve participação significativa do TNF- α no processo inflamatório induzido pela ligadura no grupo DPE, e que estes níveis se mostraram diminuídos nos grupos tratados com α , β -amirina, na concentração de 5 mg/kg, e com a dexametazona. Verificou-se, também, redução significativa da mieloperoxidase nos grupos tratados com α , β -amirina, nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg, e com a dexametazona, e, portanto, uma diminuição no influxo de neutrófilos, estando estes resultados de acordo com os trabalhos de Bombini *et al.* (2004) ao concluírem que o recrutamento de neutrófilos é mediado pelo TNF- α , uma vez que o acúmulo de neutrófilo é inibido pelos múltiplos tratamentos anti-TNF- α , como pentoxifilina, talidomida e dexametazona, e,

também, por anticorpos anti-TNF- α . Além disso, estudos recentes (SHISHODIA *et al.*, 2003) sugerem que o ácido ursólico e oleanólico, compostos com estruturas químicas semelhantes ao da α , β -amirina, inibem a Ikappa Balpha-quinase e a fosforilação da p65, gerando supressão da ativação do NF-kappaB. Possivelmente em razão da identidade estrutural, é provável que a α , β -amirina possua essas mesmas propriedades e possa modular a ativação da NF-kappaB, a qual está envolvida com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α .

Neutrófilos podem contribuir para destruição tecidual por meio da produção de metabólitos oxigênio-reativos, enzimas e citocinas, os quais amplificam a resposta inflamatória (SALVEMINI *et al.*, 2001). A atividade da mieloperoxidase (MPO) é um indicador da presença de neutrófilos nos tecidos inflamados. É demonstrado que o nível da mieloperoxidase é mais alto em locais com periodontite (WOLFF *et al.*, 1997). Estudos de Yamalik *et al.* (2000) também constataram que a atividade total da mieloperoxidase e a sua concentração em locais sadios era significativamente menor do que em locais com periodontites. Concordando com os trabalhos de Yamalik, (2000) e de Wolff, (1997), este estudo demonstrou aumento significativo no nível total na quantidade da mieloperoxidase no tecido gengival de ratos 24 horas após a colocação da ligadura (grupo DPE), quando comparado com o grupo falso-operado. O aumento no nível da mieloperoxidase pode contribuir para maior eficácia na morte bacteriana, mas, por outro lado, pode também aumentar a formação de ácido hipocloroso, o qual pode ser deletério para a saúde periodontal, uma vez que ele pode inibir a atividade do α 1-antiprotease, a elastase é ativada (YAMALIK *et al.*, 2000). No presente trabalho, observou-se que nos grupos pré-tratados com α , β -amirina com 5 e 10 mg/kg e com 1 mg/kg de dexametasona, os níveis da mieloperoxidase foram significativamente mais baixos quando comparados com o grupo que recebeu somente veículo (DPE), não sendo, contudo, significativamente diferente dos valores obtidos no grupo falso-operado. Esta inibição significativa nas taxas de mieloperoxidase pela α , β -amirina pode ser benéfica em paralisar a progressão da periodontite. Embora o lumiracoxibe tenha demonstrado uma tendência para inibir a atividade da MPO, seu efeito foi estatisticamente não significante.

O ensaio das substâncias ácido-reativas tiobarbitúricas (TBARS) é um teste comumente aplicado para medir a atividade de radicais livres (TUTER; KURTIS; SERDAR, 2001). Neste, os ácidos tiobarbitúricos reagem com aldeídos, tais como os malondialdeídos, produzindo TBARS, e a mensuração das TBARS é um índice útil da deterioração oxidativa.

Um nível elevado de peroxidação lipídica poderá desempenhar um papel na inflamação e destruição do periodonto na periodontite. Os portadores de periodontite apresentam um nível de TBARS significativamente mais alto do que pessoas com gengivas saudáveis (PANJ MURTHY; MANOHARAN; RAMACHADRAN, 2005), e isto sugere que as substâncias ácido-reativas tiobarbitúricas (TBARS) do tecido gengival estão estritamente associadas com o estado periodontal e suas mensurações poderão servir de guia valioso no tratamento e monitoramento da progressão da doença periodontal. Neste estudo, verificou-se que o trauma tecidual induzido por ligadura no grupo DPE esteve associado com altos níveis de peroxidação lipídica, estando de acordo com trabalho de Di Paola *et al.* (2005). Além disso, tanto a α , β -amirina quanto a dexametasona foram capazes de reduzir significativamente a formação de TBARS associado com a periodontite experimental. Assim, a α , β -amirina pode ter uma potencial aplicabilidade no tratamento e no monitoramento da progressão da doença periodontal.

Constantemente, observa-se que o tratamento tópico reduz a gengivite enquanto o tratamento sistêmico previne a perda do osso alveolar (XU; WEI, 2006). O desenvolvimento de formulações tópicas (ex.: géis, dentifrícios, soluções bucais) com aplicações diárias pode ser de particular interesse, uma vez que pode auxiliar a reduzir qualquer efeito sistêmico, se usado por tempo prolongado. Estudos futuros devem ser direcionados no potencial benéfico da utilização da α , β -amirina como agente antiinflamatório tópico nos distúrbios relacionados com a periodontite.

Os achados desta investigação demonstraram pela primeira vez, que a α , β -amirina modula a inflamação periodontal aguda por intermédio da redução da infiltração de neutrófilos, do estresse oxidativo e da produção da citocina TNF- α pró-inflamatória, e sugerem que a α , β -amirina pode ser útil como um agente terapêutico no tratamento da gengivite, bem como para retardar a progressão para a periodontite.

Modelos animais são largamente empregados em benefício da compreensão da patogênese da doença periodontal inflamatória e na avaliação de suas variadas modalidades terapêuticas. Embora não devam ser esperadas respostas idênticas a agressões semelhantes entre as diferentes espécies, modelos animais podem funcionar como modelos de tendências biológicas e fornecer informações impossíveis de se obter em humanos. Neste sentido, os ratos geralmente são alvos de estudos experimentais da doença periodontal inflamatória, em

virtude das grandes semelhanças com os humanos em relação à arquitetura da região de molares, inclusive da junção dentogengival, baixo custo de pesquisa, fácil manuseio e disponibilidade de utilização de várias raças com diferentes estados microbiológicos e imunológicos (LISTGARTEN, 1975; KLAUSEN, 1991; WEINBERG; BRAL, 1999). Além disso, estudos longitudinais da doença periodontal em humanos suscitam vários problemas, como a determinação do nível da atividade da doença, riscos individuais e suscetibilidade à progressão da enfermidade. Então, é importante escolher um modelo animal experimental que compartilhe características semelhantes com relação à anatomia e à doença periodontal inflamatória humana (KLAUSSEN, 1991; WEINBERG; BRAL, 1999).

Neste trabalho, analisou-se a importância do fator retentivo de placa bacteriana no curso evolutivo da doença periodontal experimental (DPE) induzida em ratos, com a colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores, de acordo com modelo animal de DP anteriormente descrito (SALLAY *et al.*, 1982). Neste estudo, a análise da doença periodontal foi feita na maxila, pois restou demonstrado que pouca ou nenhuma perda óssea pode ser observada na mandíbula de animais infectados com microorganismos periodontopatogênicos, por diferentes intervalos de tempo, e que a exfoliação ficou, na maioria das vezes, restrita à maxila (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH, 1978).

Modelos experimentais semelhantes foram também utilizados por vários pesquisadores (CRAWFORD; TAUBMAN; SMITH, 1978; SALLAY *et al.*, 1982; SAMEJIMA; EBISU; OKADA, 1990; KLAUSEN, 1991; BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2002; AZOUBEL *et al.*, 2007). Neste modelo, a ligadura age tanto como um fator promotor da formação de placa dentobacteriana, quanto como um trauma mecânico na área gengival, provocando achatamento e deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal, bem como reduzindo a integridade tecidual pela ulceração ocasional do epitélio sulcular, o que permite intensa interação hospedeiro-placa dentobacteriana. A iniciação da doença periodontal inflamatória experimental por bactérias é bem documentada e o resultado final, que envolve destruição do osso alveolar e de outros tecidos conjuntivos, é prontamente observado (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2002; Di PAOLA *et al.*, 2005; AZOUBEL *et al.*, 2007).

Esse modelo mostrou-se capaz de reproduzir as principais alterações encontradas na periodontite humana, o que o torna adequado para o estudo dessa doença (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000).

Observou-se, quando da avaliação morfométrica da hemiarcada superior esquerda dos animais operados, submetidos à DPE, que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal experimentalmente, quando comparada com sua hemiarcada contralateral, utilizada como controle; o modelo foi capaz de reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, como a reabsorção óssea alveolar, a perda de contato interdental e mobilidade dental em comparação aos animais normais, não submetidos à cirurgia. O grupo falso-operado mostrou discreta reabsorção óssea, sem exposição de raiz, sem perda de contato interdental e sem mobilidade dental.

Trabalho realizado por Bezerra *et al.* (2000), demonstrou que a perda óssea alveolar (POA) foi observada a partir do 4º dia e sua progressão foi constatada até o 11º dia, atingindo os seus valores máximos, quando observaram significativa perda óssea alveolar, avaliadas pelo índice de perda óssea (IPO) e análise histopatológica.

Este estudo experimental também foi realizado até o 11º dia, no qual se observou que os resultados estavam de acordo com aqueles obtidos por Bezerra *et al.*(2000) pois, na observação da maxila do grupo operado, havia migração apical do epitélio, extensa reabsorção óssea, deslocamento do ponto de contato e mobilidade dental. Estes dados foram confirmados em análise histopatológica, observando-se no grupo operado, (DPE) infiltrado celular acentuado, grande número de osteoclastos, processo alveolar ausente e destruição acentuada do cemento. Por outro lado, no grupo falso-operado, foram notados infiltrado celular discreto, escassos osteoclastos e processo alveolar preservado.

A observação macroscópica nas maxilas com DPE, tanto pela face vestibular como pela palatina, demonstrou aumento maior no IPO na superfície vestibular. Esse achado pode decorrer da posição do fio de náilon após a sua colocação, onde o nó que une suas pontas fica voltado para a face vestibular, de modo que a superfície do fio de náilon localizada na face vestibular é maior e mais irregular do que aquela na face palatina.

Análise comparativa da altura óssea histométrica e morfométrica na periodontite induzida por ligadura foi realizada por Fernandes *et al.* (2007). Medidas histométricas da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar foram realizadas. Fotografias padronizadas foram utilizadas na análise morfométrica. Após a efetuação dos testes estatísticos, observaram que não houve diferença estatística entre os dois métodos na detecção da altura óssea associada à colocação de ligaduras em ratos.

O tratamento de animais com α , β -amirina na dose de 5 mg/kg não preveniu a reabsorção óssea, não causando, no entanto, aumento, o que ocorreu na concentração de 10 mg/kg e nos controles positivos lumiracoxibe e dexametasona, que apresentaram uma reabsorção óssea mais elevada, embora sem diferença estatística em relação ao grupo DPE. Estudos prévios descrevem a α , β -amirina como possuidora de atividades antimicrobianas (KATERERE *et al.*, 2003), antidepressivas (OLIVEIRA *et al.*, 2004), antiinflamatórias (OLIVEIRA *et al.*, 2005). No presente ensaio, em relação às alterações histopatológicas, observou-se que a α , β -amirina 5 e 10 mg/kg forneceu menor grau de alteração inflamatória gengival quando comparada ao grupo DPE, embora não demonstrando diferença estatística significativa. Isto, provavelmente, ocorreu em razão do tamanho reduzido da amostra. Desta forma, a diferença encontrada entre os grupos é sugestiva, no entanto, não conclusiva.

No estudo histopatológico das alterações no osso alveolar, constatou-se que a α , β -amirina mostrou desempenho inferior ao da lumiracoxibe e da dexametasona na prevenção da reabsorção óssea alveolar. Estes achados sugerem que a α , β -amirina apresentou comportamento semelhante aos corticosteróides, inibindo a ação antiinflamatória, porém, não prevenindo a reabsorção óssea.

Comparando-se os resultados encontrados durante análise morfométrica e histopatológica, foram encontradas incoerências quanto a ação das drogas nestes parâmetros, o que pode ser mais um indicativo de que a amostra reduzida estaria interferindo nos resultados.

Inibidores de COX-2 parecem ser promissores para o controle da dor dental e para o tratamento de suporte da doença periodontal inflamatória. Drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) são usadas para a terapia periodontal, provas experimentais em animais e além de estudos clínicos mostrando que AINEs estabilizam as condições periodontais

mediante a redução da taxa de reabsorção do osso alveolar (HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; TSCHOPPE; KIELBASSA, 2006).

Bezerra *et al.*, 2000, investigando se um inibidor seletivo da ciclooxygenase do tipo 2 (meloxicam) seria capaz de alterar a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite em ratos, quando comparado à indometacina, um inibidor não seletivo de COX-2. Em relação aos resultados, após exame histopatológico das maxilas dos grupos não tratados (DPE), observaram significativa perda óssea, aumento no influxo celular, aumento no número de osteoclastos e perda ponderal. A indometacina e meloxicam reduziram a perda óssea, as alterações histopatológicas, influxo celular e a perda ponderal, concluindo, assim, que a inibição da COX-2 preveniu a perda óssea nesse modelo de doença periodontal. Outros autores (NASSAR *et al.*, 2005) obtiveram o mesmo resultado.

Outro trabalho realizado por Holzhausen *et al.*, 2002, desta vez com celecoxibe 10 e 20 mg/kg ou 10 ml/kg, mostrou que os grupos tratados com esta droga apresentavam significativamente uma menor perda óssea quando comparados com o grupo-controle e concluíram que a terapia sistêmica com celecoxibe pode modificar a progressão da periodontite induzida experimentalmente em ratos.

Nassar *et al.* (2005) testaram o efeito de um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2, meloxicam, na progressão da perda óssea alveolar na doença periodontal experimental induzida por ligaduras em ratos, separados em oito grupos. Quatro grupos foram tratados por cinco ou 15 dias com uma dose diária de 15 mg/kg de peso corpóreo com meloxicam. Os outros grupos foram tratados como controle positivo e controle negativo dentro de cada período experimental. Radiografias digitais padronizadas foram realizadas para medir a perda óssea na região mesial do primeiro molar inferior de cada rato. O efeito do tratamento com meloxicam não induziu alteração de peso ou quaisquer manifestações sistêmicas visíveis. A análise de variação indicou que os grupos tratados com meloxicam após cinco dias apresentavam perda óssea alveolar significativamente menor ($p < 0,05$). Por outro lado, a perda óssea não foi significativa após os 15 dias de tratamento com meloxicam. Os dados apresentados sugerem que o tratamento com meloxicam pode modificar a progressão da periodontite experimental em ratos no período experimental inicial.

O efeito do etoricoxibe (3 ou 9 mg/kg), um inibidor seletivo de COX-2, e indometacina (5 mg/kg), um inibidor não seletivo de ciclooxigenase, foram avaliados por Azoubel *et al.* (2007), em um modelo de periodontite experimental em ratos. A análise histopatológica do periodonto mostrou que etorocoxibe e indometacina reduziram a infiltração de células inflamatórias, a destruição de fibras colágenas, cemento e a reabsorção óssea alveolar. Os animais que receberam indometacina apresentaram perda de peso iniciada no 7º dia, e alta taxa de mortalidade (58,3%), em comparação com o eterocoxibe (0%).

Estudos realizados por Fricke *et al.*, (2008), para demonstrar a superioridade de apenas uma dose de lumiracoxibe 400 mg, em comparação com 400 mg de celecoxibe ou placebo em pacientes com dores de moderada a severa após cirurgia para remoção de dentes inclusos, concluíram que lumiracoxibe 400 mg foi bem tolerado e proporcionou superior analgesia quando comparado ao celecoxibe 400 mg ou placebo.

Nesta conjunção de ensaios, verificou-se que o lumiracoxibe, na dose de 20 mg/kg v.o., não preveniu a reabsorção óssea, tendo esta sido observada ser maior do que nos animais do grupo DPE, apresentando um desempenho semelhante ao da dexametasona.

Os resultados deste trabalho destoam daqueles obtidos Bezerra *et al.* (2000), Holzhausen *et al.* (2002), Nassar (2005) e Azoubel (2007), que ao estudarem a ação de inibidores seletivos da COX-2, observaram que eles inibiram a reabsorção óssea alveolar induzida por ligaduras em ratos.

Os corticostróides, classificados por Ferreira (1990) como drogas inibidoras da fosfolipase A₂, não somente diminuem a síntese das prostaglandinas como também dos leucotrienos, reduzindo, portanto, o acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório. Este parece ser o maior mecanismo de ação antiálgico e antiinflamatório atribuído a este grupo de medicamentos, pois o controle da migração de neutrófilos para o foco inflamatório diretamente implica a diminuição dos mediadores químicos pró-inflamatórios.

A dexametasona é um fármaco que apresenta potente efeito antiinflamatório e imunossupressor (RANG, 2003). Neste trabalho, a dexametasona, na concentração de 1 mg/kg,i.p, não inibiu a reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Este resultado está de acordo com os de Cavagni *et al.* (2005), ao observarem que a dexametasona

aumentou a média de perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em relação ao grupo-controle, e que não foram observadas diferenças significativas intergrupos nos dentes sem ligadura.

A administração sistêmica de dexametasona por longo tempo está comumente associada com redução na massa óssea total, a qual é interpretada como aumento na atividade da reabsorção óssea (LUCKERT; RAISZ, 1990). Para Metzel *et al.* (2002), a administração de dexametasona tem como efeito colateral gastrointestinal uma má absorção e que resulta na inibição do ganho de peso nos animais tratados.

A variação de massa corpórea dos animais submetidos à doença periodontal também foi utilizada como parâmetro neste estudo. As massas corpóreas dos animais foram medidas imediatamente antes da cirurgia e, em dias alternados, até o 11º dia. Perda significativa de massa corpórea dos animais no primeiro dia após a cirurgia foi verificada, provavelmente, em razão ao trauma cirúrgico e, como consequência, a inflamação aguda, caracterizada no estudo hematológico pelo aumento na mieloperoxidase, em decorrência do influxo aumentado do neutrófilo para o foco inflamatório, a qual estaria dificultando a alimentação dos animais. À medida que os sinais agudos da inflamação começaram a se dissipar, observou-se tendência de estabilização da massa corpórea, porém, sem ganho de peso significativo, tampouco perda acentuada, como restou constatado no primeiro dia, a não ser no grupo tratado com dexametasona, que mostrava perda de massa, diferentemente do grupo não operado, que apresentava ganho progressivo. É interessante observar que a redução do processo inflamatório implica maior ingestão de alimentos pelos animais, evitando perda de massa corpórea. Na avaliação da massa corpórea, notou-se que a α , β -amirina na dose de 5 e 10 mg/kg e o lumiracoxibe, decorrente da diminuição do processo inflamatório, sucedeu um aumento de peso na massa corpórea dos animais, embora menor do que os animais normais (sem DPE), enquanto com o grupo da dexametasona ocorreu redução. Para Metzel *et al.* (2002), a administração de dexametasona tem como efeito colateral gastrointestinal uma má absorção e que resulta na inibição do ganho de peso nos animais tratados.

Breivik *et al.* (2006) estudaram o efeito da dexametasona sobre a variação no peso corpóreo de ratos recém-nascidos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de dexametasona. Após 90 dias, os ratos receberam ligaduras com fios de seda em volta dos 2º molares superiores. Quarenta e quatro dias depois foram, então, sacrificados, tendo antes sido

pesados. Os resultados indicaram que o tratamento com dexametasona resultou na redução do peso corpóreo dos animais. Investigaram, também, a ação da dexametasona sobre a perda óssea alveolar, e seus resultados mostraram que os ratos tiveram significativamente menor perda óssea periodontal. Este trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Breivik et al, (2006) quanto à ação da dexametasona na redução do peso corpóreo, discrepando, no entanto, quanto a sua ação sobre a perda óssea alveolar.

A dor orofacial é uma queixa comum de pacientes que procuram cuidados médicos ou dentais. A dor orofacial é freqüente, com alta prevalência nas desordens dentais e temporomandibulares, doenças malignas, e na mucosite associada a cirurgia, quimiorradioterapia e neurotoxicidade (BENOLIEL *et al.*, 2007; EPSTEIN *et al.*, 2007). Uma ampla variedade de drogas é indicada para o tratamento da dor orofacial, as quais incluem AINEs, relaxantes musculares, opióides e antidepressivos mas, seus efeitos colaterais e toxicidades são evidentes com a administrações prolongada (DIONNE, 2001). Nos últimos anos há uma constante busca por drogas alternativas que possuam maior eficácia e segurança ao reduzir a dor inflamatória e neuropática, bloqueando a transição da dor aguda para crônica. Um aumento de substância P e CGRP foi observado na doença periodontal e isto sugere que está associada mais com o processo inflamatório do que na nocicepção (ABDEL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004). Os analgésicos mais comumente prescritos em Odontologia, para o alívio da dor aguda, incluem drogas antiinflamatórias não esteróidais, acetaminofem e várias combinações contendo opióides. Os AINEs e presumidamente acetaminofem atuam por inibição da enzima cicloxigenase responsável pela formação de prostaglandinas que promove dor e inflamação. Opióides, como codeína, hidrocodone e oxicodone estimulam os receptores de opióides endógenos para provocar efeitos analgésicos e outros (HUYNGH; YAGIELA, 2003). Estudos experimentais e clínicos confirmam que AINEs, inibidores seletivos de cicloxigenase-2 (COX-2) e dexametasona são efetivos para a prevenção e controle da dor pós-operatória em cirurgia periodontal para a raspagem e aplainamento radicular (PILATTI *et al.*, 2006; YEN *et al.*, 2008).

Considerando que α , β -amirina tem demonstrado propriedades antiinflamatórias, antinocicepção visceral e antidepressora em estudos em animais, foi avaliado, em um modelo animal, seu potencial antinociceptivo na dor orofacial induzido por capsaicina e formalina.

O presente estudo mostrou que a injeção subcutânea de capsaicina e formalina na vibrissa da bochecha de ratos produziu um comportamento nociceptivo de esfregar a face.

A capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é a molécula ativa responsável pela ardência da pimenta-vermelha, do gênero *Capsicum*. Sua importância no estudo de neuropeptídeos na pele decorre da sua capacidade de despolarizar fibras C ou A δ , ligando-se a um receptor denominado vanilóide, que abre canais iônicos, ensejando um influxo de cálcio na fibra nervosa (JANCSO; JANCSO; SZOLCSANYI, 1967; CATERINA *et al.*, 1997).

A formalina (formaldeído, aldeído fórmico ou formol) é um germicida volátil, potente, de amplo espectro, sendo efetivo contra bactérias vegetativas, fungos e muitos vírus, sendo usado na forma de vapor ou solução aquosa para a desinfecção do ambiente ou objetos, como equipamentos hospitalares e para a conservação de peças anatômicas. O vapor de formol é irritante aos olhos, nariz e ao trato respiratório. Pode causar tosse, disfagia, espasmos, edema de laringe, bronquite e pneumonia (MARTINDALE, 1989).

Os efeitos algícos da formalina e capsaicina em ambos os modelos ocorreram em virtude da liberação de mediadores tais como neuropeptídeos sensoriais e prostaglandinas (HENRY *et al.*, 1999; SANDOR *et al.*, 2007). Na dor orofacial induzida pela formalina, a primeira fase da resposta (0-5 min) corresponde a dor neurogênica aguda sensível a drogas que interagem com o sistema opióide, enquanto a segunda fase da resposta (10-20 min) corresponde a dor inflamatória que pode ser inibida por inibidores da ciclooxigenase. Drogas que atuam primariamente como analgésicos centrais poderiam inibir ambas as fases, enquanto drogas atuando periféricamente inibem apenas a segunda fase da analgesia (ROSELAND *et al.*, 1990). Em consistência com estes achados, comprovou-se que a administração sistêmica do ketorolac ou diclofenaco (10 e 30 mg/kg, i.p.) atenuou o comportamento nociceptivo induzido pela formalina na segunda fase (PADI; NAIDU; KULKARNI, 2006). Estes resultados indicam que as prostaglandinas (PGs), particularmente as PGs periféricas, estão envolvidas no comportamento nociceptivo que se segue a uma injeção de formalina na vibrissa da bochecha.

Os opióides puderam produzir analgesia por meio de mecanismos periféricos no teste com a formalina (STEIN *et al.*, 2001), o que é consistente com as observações de

Shannon e Lutz (2002) com loperamida subcutânea, um μ -opióide agonista de atuação periférica. A analgesia opióide periférica é indubitavelmente de relevância clínica, especificamente considerando-se que a terapia opióide sistêmica é frequentemente dificultada pelos seus efeitos colaterais centrais. A α , β -amirina não demonstrou ação analgésica nos teste de *tail-flick* (calor radiante na cauda) e *hot-plate* (placa quente), sugerindo falta de analgesia central (OTUKI *et al.*, 2005), mas, interessante, mostra analgesia periférica por um mecanismo naloxone sensitivo, sugerindo que poderia ter uma ação direta no receptor opióide, o qual necessita ser esclarecido em estudos futuros.

O efeito inibitório observado com a α , β -amirina sobre a capsaicina e na segunda fase da resposta de esfregar a face induzida pela formalina pode ser um resultado de sua possível inibição na liberação da substância P ou em consequência de uma ação bloqueadora direta no seu receptor Neurokinina-1(NK-1). Neste contexto, um estudo anterior forneceu evidência para a ativação iônica dos receptores NK-1 durante a segunda fase do teste com a formalina no rato, e, administrado sistemicamente, o NK-1 receptor antagonista SR 14033 bloqueia apenas a segunda fase do teste orofacial com a formalina (HENRY *et al.*, 1999; LUCCARINI *et al.*, 2003). Em um estudo mais recente, foi mostrada uma imunoatividade NK-1 diminuída em animais tratados com a α , β -amirina no modelo de nocicepção visceral induzida por ciclofosfamida (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2007).

7 CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

1. O triterpenoide pentacíclico α , β -amirina modula a inflamação periodontal na fase aguda por reduzir a infiltração de neutrófilo, o estresse oxidativo e a produção de citocinas pro-inflamatórias TNF- α e sugere que ele pode ser um agente útil para o tratamento de gengivite e possivelmente retardar a progressão da doença periodontal;
2. O triterpenoide sob investigação demonstrou atividade antiinflamatória na periodontite tanto na fase aguda como na crônica, mas não teve capacidade para prevenir a perda óssea, sendo semelhante ao inibidor da COX-2 lumiracoxibe e o corticóide dexametasona. A falha ao produzir uma inibição significativa na reabsorção óssea pelo lumiracoxibe ou α , β -amirina, sugere que seus efeitos benéficos podem ser reduzidos por outros fatores, tais como o aumento dos níveis de IL-1 beta séricos promovendo a atividade osteoclástica;
3. O triterpenoide natural α , β -amirina exerceu atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina e formalina, sugerindo o envolvimento de opióides endógenos. Ainda, sugere que esta ação do α , β -amirina pode estar intimamente ligada a sua ação antiinflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

ABRAMSON, S. B.; CHERKSEY, B.; GUDE, D.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; PHILIPS, M. R.; BLAU, L.; WEISMANN, G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 11-30, Feb. 1990.

ABDEL-ALEEM, S. A.; MORALES-AZA, B. M.; DONALDSON, L. F. Sensory neuropeptide mRNA upregulation is bilateral in periodontitis in the rat: a possible neurogenic component to symmetrical periodontal disease. **Eur. J. Neurosci.**, v.19, p.650-658, 2004.

AGAR, E.; BOSNAK, M. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v. 10, n. 8, p. 1799-1801, June 1999.

AGARWAL, S.; BARAN, C.; PIESCO, N. P.; QUINTERO, J. C.; LANGKAMP, H. H.; JOHNS, L. P.; CHANDRA, C. C. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. **J. Periodontal. Res.**, v.30, n. 6, p. 382-389, Nov. 1995.

ANDRADE, E. D. Uso de medicamentos na prevenção e controle da dor. *In: _____*. **Terapêutica medicamentosa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 45-64.

ANDREEVA, L.; RANG, H. P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, n. 1, p. 185-190, 1993.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M.; JUNIOR, A. P.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha - and beta amyryn from *Prothium hepataphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 85, n. 4, p. 827-834, Dec. 2006.

ASSUMA, R.; OATES, S.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J. Immunol.**, v. 160, p. 403-409, 1998.

AUSTIN, C. E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H. E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D. J.; BATHON, J. M.; PROUD, D. Stable expression of the human kinin B₁ receptor in chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 17, p.11420–11425, 1997.

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

BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontol**, 2000, v. 40, n. 1, p. 29-49, 2006.

BARR-AGHOLME, M.; MODEER, T.; LUTHMAN, J. Immunohistological study of neuronal markers in gengiva obtained from children with Down's syndrome. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 624-633, 1991.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, n.7/9, p. 58-60, 2005.

BEICHE, F.; SCHEUERER, S.; BRUNE, K.; GEISSLINGER, G.; GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **FEBS Lett.**, v. 390, n. 2, p. 165-169, July 1996.

BELIZÁRIO, J. E. Citocinas: os guias da defesa do organismo. **Ciência Hoje**, v. 38, p. 36-43, 2006.

BENOLIEL, R.; EPSTEIN, J.; ELIAV, E.; JUREVIC, R.; ELAD, S. Orofacial pain in cancer: part I – mechanisms. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 6, p. 491–505, 2007.

BERTOLINI, D. R.; NEDWIN, G. E.; BRIGMAN, T. S.; SMITH, D. D.; MUNDY, G. R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. **Nature**, v. 319, p. 516-518, 1986.

BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Selective Cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6., p.1009-1014, June 2000.

BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Bloqueio seletivo da ciclooxigenase tipo 2 inibe a reabsorção óssea inflamatória em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 41, n. 1, p. 7-13, jan./fev. 2001.

BISSADA, N. F.; NG, V. W. Clinical evaluation of systemic doxycycline and Ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 7, p. 772-776, 1998.

BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A. C.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 496, n. 1-3, p. 197-204, Aug 2004.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G.; LEMOS, T. L.; MATOS, F. J.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 3, n. 40, p. 349-356, 2007.

BOZIC, C. R.; LU, B.; HÖPKEN, U. E.; GERARD, C.; GERARD, N. P. Neurogenic Amplification of immune complex inflammation. **Science**, v. 273, n. 5282, p. 1722-1725, Sept. 1996.

BOZZA, P. T.; YU, W.; PENROSE, J. F.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 6, p. 909-920, 1997.

BRECX, M. C.; SCHLEGEL, K.; GEHR, P.; LANG, N. P. Comparison between histological and clinical parameters during human experimental gingivitis. **J. Periodontol. Res.**, v. 22, n. 1, p. 50-57, Jan. 1987.

BREIVIK, T.; GUNDERSEN, Y.; OSMUNDSSEN, H.; FONNUM, F.; POSTAD, P. K. Neonatal dexametasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. **J. Periodontol. Res.**, v. 41, n. 1, p. 23-32, Feb. 2006.

BROWN, J. L.; LÖE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontol**, 2000, v. 2, p. 57-71, June 1993.

BRUNE, K.; FURST, D. E. Combining enzyme specificity and tissue selectivity of cyclooxygenase inhibitors: Towards better tolerability? **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 6, p. 911-919, June 2007.

BRUNETTI, M. C.; FERNANDES, M. I.; MORAES, R. G. de. **Fundamentos da Periodontia**: teoria e prática. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

CARRANZA, F. A. **Compêndio de periodontia**. Buenos Aires: Mundi, 1976.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, N. G. As estruturas de suporte do dente. *In*: CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G. **Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 6. p. 87-107.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CAVAGNI, J.; SOLETTI, A. C.; GAIO, E. J.; RÖSING, C. K. The effect of dexametazona in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in wistar rats. **Braz. Oral Res.**, v. 19, n. 4, p.290-294, 2005.

CHAMBRONE, L. A.; CHAMBRONE, L. Tooth loss in well-maintained patients with v. 33, n. 10, p. 759-764, Oct. 2006.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUEL, T.; WODS, A.; RABOISON, P. The orofacial formalin test in rats: effect of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, n. 3, p. 295–301, 1995.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, G. F.; ANDRADE, C. H. S. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. *In*: CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 3, p. 44-78, 2000.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **J. Pain**, v. 1, n. 3, supl. 1, p. 35-44, 2000.

COTRAN, R. S.; KUNAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 1, p. 44-78.

CORRÊIA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

CRAWFORD, J. M.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J. The natural history of periodontal bone loss in germfree rats infected with periodontopathic microorganismos. **J. Periodontal Res.**, v. 13, n. 4, p. 316-325, 1978.

DAROUT, I. A.; ALBANDER, J. M.; SKAUG, N. Periodontal status of adult Sudanese habitual users of miswak chewing sticks or tooth brushes. **Acta Odontol. Scand.**, v. 58, n. 1, p. 25-30, 2000.

DIAS, L. Z. S.; PIOL, S. A. C.; ALMEIDA, C. S. L. Atual classificação das doenças periodontais **Rev. Odontol.**, v. 8, n. 2, p. 59-65, 2006.

DIONNE, R. A. Pharmacologic advances in orofacial Pain: from molecules to medicine. **J. Dental Edu.**, v. 65, n. 12, p.1393-1403, 2001.

Di PAOLA, R.; MAZZON, E.; ZITO, D.; MAIERE, D.; BRITTI, D.; GENOVESE, T.; CUZZOCREA, S. Effects of Tempol, a membrane permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 8, p. 1062-1068, 2005.

Di PAOLA, R.; MAZZON, E.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; TERRANS, D.; GRECO, S.; BRITTI, D.; SANTORI, D.; OTERI, G.; CORDASCO, G.; CUZZOCREAS, S. Effects of etanercept, a Tumor necrosis-alpha antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, p. 286-297, 2007.

DIXON, D. R.; BAINBRIDGE, B. W.; DARVEAU, R. P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. **Periodontol 2000**, v. 35, p. 53-74, 2004.

DOURSOUT, M.; LIANG, Y.; CHELLY, J. E. Nos inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Can. J. Anesth.**, v. 50, n. 9, p. 909-916, Nov. 2003.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, n. 6, p. 704-712, 1997.

DUBNER, R.; BASBAUUM, A. I. Spinal dorsal horn plasticity following tissue of nerve injury. *In*: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. New York: Churchill Livingstone, 1994. p. 225-241.

DUMITRESCU, A. L.; EL-ALEEM, A. S.; MORALES-AZA, B.; DONALDSON, L. F. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 8, p. 596-603, Aug. 2004.

EPSTEIN, J. B.; ELAD, S.; ELIA, V. E.; JUREVIC, R.; BENOLIEL, R. Orofacial pain in cancer: part II- clinical perspectives And management. **J. Dental Res.**, v. 86, n. 6, p. 506-518, 2007.

ESSER, R. E.; MISERENDINO-MOLTENI, R.; SHARR, M.; ZHANG, X.; PORTER, W.; RAMOS, L.; CRAMER, J. A.; ZHUANG, S.; GEOGIERVA, A.; MANIARA, W. Pharmacodynamic behaviour of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor lumiracoxibe in the lipopolysaccharide stimulated rata ir pouch model. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 25, p. 25-30, 2005.

FARIAS, R. J. M.; VENANCIO, R. A.; CAMPARIS, C. M. Alterações sistêmicas e suas relações com dores faciais. **JBA-J. Bras. Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 2, n. 6, p. 121-126, 2002.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissue. **Periodontol** 2000, v. 40, n. 1, p. 50-76, 2006.

FERNANDES, M. I.; GAIO, E. J.; OPPERMAN, R. V.; RADOS, P. V.; ROSING, C. K. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Braz. Oral Res.**, v. 21, n. 3, p. 216-221, 2007.

FERREIRA, S. H. A classification of peripheral analgesics based upon their modo of action. *In*: SANDLER, M.; COLLINS, G. M. **Migraine**: spectrum of ideas. London: Oxford University Press, 1990. p. 59-72.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: ABC, 1998.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, n. 3, p. 1227-1231, 1993.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, n. 2, p. 129-141, 1999.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMISTU, T.; TAKESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 β in the rat. **Brain Res.**, v. 657, p. 133-140, 1994.

FREITAS, J. A. S.; ÁLVARES, L. C.; TAVANO, O. **Anatomia radiográfica dento-maxilar**. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, 1976.

FRICKE, J.; DAVIS, N.; YU, V.; KRAMMER, G. Lumiracoxibe 400 mg comparad with Celecoxib 400 mg and placebo for treating pain following dental surgery: a randomized, controlled trial. **J. Pain**, v. 9, n. 1, p. 20-27, 2008.

GALLEGOS, R. S.; ROQUE, N. E. Análise de misturas de Triterpenos por ^{13}C NMR. **Quim. Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

GARRISON, S. W.; HOLT, S. C.; NICHOLS, F. C. Lipopolysaccharide-stimulate PGE₂ release from human monocytes. Comparison of lipopolysaccharides prepared from suspect periodontal pathogens. **J. Periodontol.**, v. 59, n. 10, p. 684-687, Oct. 1988.

GARRISON, S. W.; NICHOLS, F. C. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but no IL-1 beta in patients with adult periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 24, n. 2, p. 88-95, Mar. 1989.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of th1/th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontol** 2000, v. 35, p. 21-41, 2004.

GENCO, R. J. Host response in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, n. 4, supl., p. 338-355, 1992.

GENCO, R. J.; HO, A. W.; GROSSI, S. G.; DUNFORD, R. G.; TEDESCO, L. A. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 7, p. 711-723, 1999.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Exp. Neurol.**, v. 192, n. 1, p. 163-166, Mar. 2005.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GURGEL, B. C. V. **Influência do meloxicam sobre a perda óssea alveolar em periodontite**: análise histométrica em ratos. 2003. 85 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

HAYNES, D. R. Emerging and future therapies for the treatment of bone loss associated with chronic inflammation. **Inflammopharmacology**, n. 14, p. 193-199, 2006.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, G. M.; CHABOT, J. G.; CODERRE, T. J. An evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of formalin test in the rat. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 15, p. 6588-6598, 1999.

HOLDEN, J. E.; PIZZI, J. A. The challenge of chronic pain. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 55, p. 935-948, 2003.

HOLZHAUSEN, M.; ROSSA JUNIOR, C.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; NASSAR, P. O.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; SPOLIDÓRIO, L. C. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 1030-1036, 2002.

HUGOSON, A.; LJUNGQUIST, B.; BREIVIK, T. The relationship of some negative events and psychological factors to periodontal disease in an adult Swedish population 50-80 years of age. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 247-253, 2002.

HUYNGH, M. P.; YAGIELA, J. A. Current concepts in acute pain management. **J. Calif. Dent Assoc.**, v.31, n.5, p.419-427, 2003.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neurosci. Res.**, v. 42, p. 299-332, 2001.

JIANG, Y.; MEHTA, C. K. S.; HSU, T. Y.; ALSULAIMANI, F. F. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. **Infect. Immun.**, v. 70, p.3143-3148, 2002.

JEFFCOAT, M. K.; WILLIAMS, W. J.; WECHTER, H. G.; JOHNSON, H. G.; KAPLAN, J. S.; GANDRUP, J. S. *et al.* Flurbiprofen treatment of periodontal disease in beagles. **J. Periodontal Res.**, v. 21, p. 624-633, 1986.

JANCZO, N.; JANCZO, G. A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **British Journal of Pharmacology**, v. 31, p. 138-151, 1967.

JOHANNSEN, A.; RYLANDER, G.; SODER, B.; ASBERG, M. Dental plaque, gingival inflammation, and elevated levels of interleukin-6 and cortisol in gingival crevicular fluid from women with stress-related depression and exhaustion. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 8, p.1403-1409, Aug. 2006.

JORDAN, H. V. Rodent model systems in periodontal disease research. **J. Dent. Res.**, v. 5, n. 2, p. 235-242, 1971.

JORDAN, H. V.; KEYES, P. H.; BELLACK, S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. **J. Periodontal Res.**, v. 7, p. 21-28, 1972.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, n.1, p.81-88, 2003.

KINANE, D. F.; LINDHE, J. Patogênese da periodontite. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 127-152.

KINANE, D. F.; PETERSON, M.; STATHOPOULOU, P. G. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. **Periodontol** 2000, v. 40, n. 1, p. 107-119, 2006.

KLAUSEN, B. Microbiological and imunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article **J. Periodontol.**, v. 62, n. 59-73, 1991.

KOIDE, M.; SUDA, S.; SAITON, S.; OFUJI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHIE, H.; TAKAI, M.; ONO, Y.; TANIGUCHI, Y.; HARA, K. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 420-434, 1995.

KUSHNIR-SUKHOV, N. M.; BROW, J.; YALIN, W.; KIRSHENBAUM, A.; METCALFE, D. D. Human mast cells are capable of serotonin syntesis and release. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.119, n.2, p.498-499, 2007.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.

KRUEGER, C. D.; WEST, P. M.; SARGENT, M.; LODOLCE, A. E.; PICKARD, A. S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. **Ann. Pharmacother.**, v. 41, n. 2, p. 276 – 284, 2007.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestesiol.**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LANE, N. E. Pain management in osteoarthritis. The role of COX-2 inhibitors **J. Rheumatolol.**, Toronto, v. 24, Suppl. 49, p. 20-24, 1997.

LASCALA, N. T. Significado clínico e preventivo da cárie e doenças periodontais na odontologia. In: LASCALA, N. T. **Prevenção na clínica odontológica: promoção de saúde bucal.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 3, p. 21-27.

LEITÃO, R. F. de C. **Estudo do papel do óxido nítrico na doença periodontal experimental.** 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

LEITÃO, R. F. C.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontites in rats. **J. Periodontol**, v.75, n.9, p.1227-1231, 2004.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A. C.; LIMA, V.; BRITO, G. A. C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol**, v.76, n.6, p.956-963, 2005.

LLAVANERAS, A.; GOLUB, L. M.; RIFKIN, B. R.; HEIKKILA, P.; SORSA, T.; TERONEN, O. *et al.* CMT-8/clodronate combination therapy synergistically inhibits alveolar bone loss in LPS-induced periodontitis. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 878, p. 671-674, 1999.

LI, J. X.; LIUA, C. C.; HEA, Z.Y.; YU, Y.; DUA, S; KADOTA, H. S. Triterpenoids from *Cimicifugae rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. **Maturitas**, v. 58, n. 1, p. 59-69, Sep 2007.

LI, K. L.; VOGEL, R.; JEFFCOAT, M. K.; ALFANO, M. C.; SMITH, M. A.; COLLINS, J. G.; OFFEMBACHER, S. The effect of ketoprofen creams on periodontal disease in rhesus monkeys. **J. Periodontol. Res.**, v. 31, n. 8, p. 525-532, Nov. 1996.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci. USA**, v. 108, p. 123-129, 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol**, v. 75, n.1., p.162-8, 2004.

LIMA-JUNIOR, R. C. P.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J. M.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. E. *et al.* Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.**, v. 72, p. 34-39, 2006.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; SANTOS, F. A.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H. *et al.* Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene α , β -amyrin in a mouse modelo of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors and K⁺ATP channels. **Inflamm. Res.**, v. 56, n. 12, p. 487-494, Dec. 2007.

LINDEMANN, R. A.; ECONOMOU, J. S.; ROTHERMEL, H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extrated lipopolysaccharides. **J. Dent. Res.**, v. 67, p. 1131-1135, 1988.

LINDHE, J.; HAMP, S. E.; LÖE, H. Experimental periodontitis in the beagle dog. **J. Periodontal Res.**, v. 8, p. 1-10, 1973.

LINDHE, J.; HAMP, S. E.; LÖE, H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. **J. Periodontal Res.**, v.10, n. 5, p. 243-245, Nov. 1975.

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAÚJO, M. Anatomia do periodonto. *In*: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan Ltda, 2005.

LINDHE, J.; PARODI, R.; LILJENBERG, B.; FORNELL, J. Clinical and structural alterations characterizing healing gingiva. **J. Periodontal Res.**, v. 13, p. 410-424, 1978.

LINDHE, J.; RYLANDER, H. Experimental gingivitis in young dogs. **Scand. J. Dental Res.**, v. 8, p.1-10, 1975.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationships in the gingival of rat and human. **J. Periodontol.**, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1/2, p. 92-94, 2005.

LÖE, H.; MORRISON, E. Periodontal health and disease in young people: screening for priority care. **Int. Dental J.**, v. 36, p. 162-167, 1986

LÖE, H.; TYHEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, v. 36, p. 177-187, 1965.

LOFGREN, O.; QI, Y.; LUNDBERG, T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally-induced inflammatory reactions in rat mode. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 125-129, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LUCCARINI, P.; HENRY, M.; ALVAREZ, P.; GAYDIER, A. M.; DALLEL, R. Contribution of neurokinin 1 receptors in the cutaneous orofacial pain. **Naunin-Schmiedeberg's Archiv. Pharmacol.**, v. 368, n. 4, p. 320-323, 2003.

LUCKERT, B. P.; RAISZ, L. G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. **Ann. Intern. Med.**, v. 112, p. 352-364, 1990.

MACFARLANE, T. V.; BLINKHORN, A. S.; DAVIES, R. M.; KINCEY, J.; WORTINGTON, H. V. Oro-facial pain in the community: prevalence and associated impact. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 30, p. 52-60, 2002.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, n.3, 291-300, 1993.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHYAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 357-386, 1998.

MARTINDALE - The extra Pharmacopeia, 29ª edição, 1989.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 6, n. 7, p. 521-532, July 2005.

MCNEIL, C.; DUBNER, R. O Que é Dor e como classificamos a Dor Orofacial *In*: LUND, J. P.; DUBNER, R; LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. **Dor orofacial: da ciência básica à conduta clínica.** São Paulo: Quintessence, 2002. p. 3-14.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1185-1236, 1997.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3037-3067, 1988.

MANOLAGAS, S. C. Role of cytokines in bone resorption. **Bone**, v. 1, n. 2, suppl., p. 63S-67S, 1995.

MARGOLIUS, H. S. Kallikreins and kinins: some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hipertension**, v. 26, p. 221-229, 1995.

MARTINS, M. D.; MARTINS, M. A. T. Etiopatogênese da doença periodontal *In*: _____. **Fundamentos de periodontia: teoria e prática.** 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007.

MENDES, C. L. A. **Triterpenóides e a sua atividade antiinflamatória.** Lisboa: Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2004.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**. Seattle: IASP Press, 1994.

METZGER, Z.; KLEIN, H.; KLEIN, A.; TAGGER, M. Periapical lesion development in rats inhibited by dexamethasone. **J. Endod.**, v. 28, n. 9, p. 643-645, 2002.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000.

MURPHY, P. G.; RAMER, M. S.; BORTHWICK, L.; GAULDIE, J.; RICHARDSON, P. M.; BISBY, M. A. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, n. 7, p. 2243–2253, 1999.

NARDI, A. **Dor orofacial, absenteísmo e qualidade de vida em trabalhadores do sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2003.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. D. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, Rio de Janeiro, v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; ABI RACHED, R. S.; HOLZHAUSEN, M.; MARCANTONIO, E.; SPOLIDORIO, L. C. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. **J Periodont Res**, v. 39, n. 3, p. 143-148, 2004.

NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; NASSAR, P. M.; SPOLIDORIO, L. C. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. **Braz. Oral Res.**, v. 19, n. 1, p. 36–40, 2005.

NOSKOV, A. D. The treatment of periodontosis by injections of aloe extract and their influence on the phosphorus-calcium metabolism. **Stomatologiia**, v. 45, n. 4, p. 13-15, 1966.

NOVAK, M. J. Classification of disease and conditions affecting the periodontium. *In*: NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H. **Carranza's clinical periodontology**. 9th ed. Califórnia: W.B.Saunders Company, 2002. p. 64-73.

NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 5, p. 2784–2791, Jan. 1998.

NYMAN, S.; SCHRODER, H. E.; LINDHE, J. Suppression of Inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. **J Periodontol**, v. 50, n. 9, p. 450-461, 1979.

OATES, T. W.; GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. L. Clinical, radiographic and biochemical assesment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n. 2, p. 137-143, 2002.

OHKAVA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OFFENBACHER, S.; WILLIAMS, R. C.; JEFFCOAT, M. K.; HOWELL, T. H.; ODLE, B. M.; SMITH, M. A.; HALL, H. G.; GOLDHABER, P. Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss. **J. Periodontal. Res.**, v. 27, n. 3, p. 207-213, 1992.

OKUDA, K.; SAKURADA, C.; TAKAHASHI, M.; YAMADA, T.; SAKURADA, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, v. 92, n. 1/2, p. 107-115, 2001.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA JUNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin sensitive primary afferent neurons. **Planta Med.**, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004.

OLIVEIRA, D. C.; ROSELL, F. L.; SAMPAIO, J. E. C.; RODRIGUES JÚNIOR, A. L. Redução do índice de placa com Listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. **Rev. Gaúcha Odontol.** Porto Alegre, v.46, n.2, p.101-104, 107-108, 1998.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; LIMA JUNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, F. A. *et al.* Protective effect of alpha-and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, n.12, p. 103-108, 2005.

OPPENHEIM, J.; RUSCETTI, F. W. Citocinas. *In*: TITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T.G. **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 10, p. 113-130.

OKENSON, J. P. **Orofacial pain**: guidelines for assessment, diagnóstico, and management. Chicago: Quintessence, 1996.

OKENSON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A. *et al.* Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005.

PADI, S. S.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, K. Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial area of rats. **Inflammopharmacology** , v. 14, p. 57-61, 2006.

PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontal. Res.**, v. 26, n. 3, pt. 2, p. 230-242, May 1991.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol. 2000**, v. 14, p. 9-11, 1997.

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

PANJMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHADRAN, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cell. Mol. Biol. Lett** , v. 10, p. 255-264, 2005.

PARNET, R. Phytochimie des Burseracées. **Lloydia** , v. 35, p. 280-287, 1972.

PELLISIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats. Effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, v. 96, n. 1/2, p. 81-87, Mar. 2002.

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

PILATTI, G. L.; ANDRÉ dos SANTOS, F.; BIANCHI, A.; CAVASSIM, R.; TOZETTO, C. W. The use of celecoxib and dexamaetasone for the prevention and control of postoperative pain after periodontal surgery. **J Periodontol**,v.77, p.1809-1814, 2006.

PISTORIUS, A.; WILLERSHAUSEN, B.; STEINMEIER, E. M.; KREISLE, M. Efficacy of subgingival irrigation using herbal extracts on gingival inflammation. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 5, p. 616-622, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Local hormones, inflammation and immune reactions. *In: _____*. **Pharmacology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.

ROBINSON, M.; HART, D.; PIGOTT, G. H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. **Lab. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 247-253, Jul. 1991.

ROCHA E SILVA, M. O. A brief history of inflammation. *In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. (Ed.)*. **Handbook of experimental pharmacology**. [S.l.]: Springer-Verlag, 1978. v. 50, n. 1, p 6-25.

RODRIGUES, C. B. C. N.; GOTTARDI, M. S. **Protocolo dos antiinflamatórios e antibióticos em implantodontia**. Vitória: Associação Brasileira de Odontologia–Secção-ES/Especialização em implantodontia, [2001]. Seminário.

RORDORF, C. M.; CHOI, L.; MARSHALL, P.; MANGOLD, J. B. Clinical pharmacology of lumiracoxib: A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. **Clin. Pharmacokinet**, v. 44, n. 12, p. 1247-1266, 2005.

ROSELAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MOELE, B.; HOLE, K. The Formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235–242, 1990.

ROSSOMANDO, E. F.; WHITE, I. A novel method for detection of TNF- α in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v. 64, n. 5 supl., p. 445-448, May 1993.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal. Res.**, v. 17, p. 263-274, 1982.

SALVEMINI, D.; MAZZON, E.; DUGO, L.; RILEY, D. P.; SERRAINO, I.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by superoxide dismutase mimetic, M40403. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 4, p. 815-827, Feb 2001

SANDOR, K.; HELYES, Z.; GYRES, K.; SZOLCSÁNYI, J.; LÁSZLÓ, J. Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. **Life Sci.**, v. 81, p. 97–102, 2007.

SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. Effect of injection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 25, p. 308-315, 1990.

SASTRAVAHA, G.; GASSMANN, G.; SANGTHERAPYTIKUL, P.; GRIM, W. D. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. **J. Int. Acad. Periodontol.**, v. 7, n. 3, p. 70-79, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR (SBED). 2005. Disponível em: <http://www.dor.org.br/dor_impactos.asp>. Acesso em: 14 abr. 2008.

SCHÄTZLE, M.; LÖE, H.; BÜRGIN, W.; ANERUD, A.; BOYSEN, H.; LANG, N. P. Clinical course of chronic periodontitis IV. Gingival inflammation as a risk factor in tooth mortality. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p. 887-901, 2003.

SCHAFERS, M.; BRINKHOFF, J.; NEUKIRCHEN, S.; MARZINIAK, M.; SOMMER, C. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- α and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 310, n. 2/3, p. 113-116, 2001.

SCHÄTZLE, M.; LÖE, H.; LANG, N. P.; BÜRGIN, W.; ANERUD, A.; BOYSEN, H. The clinical course of chronic periodontitis I. Role of gingivitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 1122-1127, 2004.

SHIBLI, J. A.; MARTINS, M. C.; NOCITI, F. H.; GARCIA, V. G.; MARCONTONIO, E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration : a preliminary histologic study in dogs. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 3, p. 338-345, 2003.

SCHWARTZ, Z.; GOULTSCHIN, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. **Periodontol.** 2000, v. 14, p. 158-172, 1997.

SCOTT, G.; RORDORF, C.; REYNOLDS, C.; KALBAG, J.; LOOBY, M.; MILOSAVLJEV, S.; WEAVER, M.; HUFF, J. P.; RUFF, D. A. Pharmacokinetics of lumiracoxib in plasma and synovial fluid. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 43, n. 7, p. 467-478, 2004.

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. **The healing forest medical and toxic plants of the northwest amazonia**. Portland, OR: Dioscorides Press, 1990.

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: BONTA, I. L.; BRAY, M. A.; PARNHAM, M. J. (Ed.). **Handbook of inflammation**. [S.l]: Elsevier, 1985. p. 27-47.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanism of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, p. 57-91, 2000.

SEYMOUR, G. J.; TAYLOR, J. J. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. **Periodontol**, v. 35, p. 9-13, 2004.

SHANNON, H. E.; LUTZ, E. A. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperimide and morphine in the formalin test in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 2, p. 253-261, 2002.

SHIBATA, Y.; SASAKI, K.; NISHIMURA, K.; HASHIMOTO, Y.; IWASAKI, S. Enhancement of phorbol ester-induced production of tumor necrosis factor-alpha by 2,6-dimethylphthlimide. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 17, n. 11, p. 1532-1534, 1994.

SHISHODIA, S.; MANJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; BHARAT, B. A. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. **Cancer. Res.**, v. 63, p. 4375-4383, 2003.

STEIN, C.; MACHELSKA, H.; BINDER, W.; SCHÄFER, M. Peripheral opioid analgesia. **Curr. Opinion Pharmacol.**, v. 1, n. 1, p. 62-65, 2001.

STOHLER, C. S. Controle da dor orofacial persistente. *In*: LUND, J. P.; DUBNER, R.; LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. **Dor orofacial: da ciência básica à conduta clínica**. São Paulo: Quintessence Editora, 2002.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA JUNIOR, O. M. de; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

SILVA, M. V.; SAMPAIO, J. E. C.; GOMES, D. A. S. G.; TOLED, D. B. E. C. O efeito de diferentes pedras de afiação sobre o ângulo de corte de instrumentos periodontais. **Rev. Periodontia**, v. 13, n. 8, Nov. 2003.

SIMON, L. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their: the importance of "cox selectivity". **J. Clin. Rheumatol.**, Philadelphia, v. 23, n. 333, p. 135-140, 1996.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. São Paulo: Medsi, 2000.

SORIANELLO, E.; SCHILLACI, R.; CHAMSON-REIG, A.; LUX-LANTOS, V.; LIBERTUUN, C. Actions of Immunosuppressor Drugs the Development of an Experimental Ovarian Tumor. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, n. 8, p. 658-664, 2002.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.**, v. 897, n. 1/2, p. 9-19, 2001.

SUGIMOTO, T.; PUJIYOSHI, Y.; XIAO, C.; HE, Y. F.; ICHIKAWA, H. Central projection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP)-immunoreactive trigeminal primary neurons in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 378, n. 3, p. 425-442, Feb. 1997.

TANI-ISHII, N.; TSUNODA, A.; TERANAKA, T.; UMEMOTO, T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 α and TNF α . **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 10, p. 1617-1623, Oct. 1999.

THEILADE, E.; WRIGHT, W. H.; JENSEN, S. B.; LÖE, H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. **J. Periodontal Res.**, v. 1, p. 1-13, 1966.

TOTANI, T.; TAKETANI, Y.; UEDA, N.; NISHISHO, T.; OHMOTO, Y.; SAKATA, Y. *et al.* Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. **J. Neurochem.**, v. 72, p. 302-309, 1999.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflamação**: uma revisão do processo. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1996.

TSCHOPPE, P.; KIELBASSA, A. M. The role of COX-2 in dentistry. Past or future? **Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.**, v. 116, n. 9, p. 880-886, 2006.

TURNBACH, M. E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate or zymosan receptors in hiperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E2 in the rat. **Pain**, v. 97, n. 1/2, p. 127-137, 2002.

TUTER, G.; KURTIS, B.; SERDAR, M. Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase 1 periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 7, p. 883-888, 2001.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan. 1995.

VANE, J. R.; WARNER, T. D. Nomenclature of COX-2 inhibitors. **Lancet**, London, v. 356, n. 9236, p. 1373-1374, 2000.

VIEIRA-JUNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de Protium heptaphyllum: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

WEINBERG, M. A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, n. 6, p. 335-340, 1999.

WILLERSHAUSEN, B; GRUBER, I.; HAMM, G. Índice de placa e sangramentos gengivais: a influência de ingredientes herbários. **Rev Assoc Paul Cir Dent.**, v. 48, n.3, p.1335-1340, 1994.

WILLIAMS, R. C.; JEFFCOAT, M. K.; HOWELL, T. H.; REDDY, M. S.; JOHNSON, H. G.; HALL, C. M.; GOLDHABER, P. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. **J. Periodontol. Res.**, v. 23, p. 225-229, 1988.

WILLIAMS, R. C. Periodontal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 6, p. 373-382, Feb. 1990.

WINKELSTEIN, B. A. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. **J. Electromyogr. Kinesiol.**, v. 14, n. 1, p. 87-93, Feb. 2004.

WOLFF, L. F.; KOLLER, N. J.; SMITH, Q. T.; MATHUR, A.; AEPPLI, D. Subgingival temperature: relation to gingival crevicular fluid enzymes, cytokines, and subgingival plaque microorganisms. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, n. 12, p. 900-906, 1997.

XIE, W.; ROBERTSON, D. D.; SIMMONS, D. L. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Drug Dev. Res.**, New York, v. 25, p. 249-265, 1992.

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

YAMALIK, N.; CAGLAYAN, F.; KILINC, K.; KILINC, A.; TUMER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 460-467, Mar. 2000.

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

PUBLICAÇÕES

Artigo 1

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammapharmacology**, v.16, p. 48-52, Feb 2008.

Artigo 2

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phymed**, 2007. doi: 10.1016/j.phymed.2007.11.016.

Short Communication

Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis

S. A. Holanda Pinto¹, L. M. S. Pinto¹, G. M. A. Cunha¹, M. H. Chaves², F. A. Santos¹, V. S. Rao^{1,*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Post-Graduation Programme in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, POB 3157, Rua Cel Nunes de Melo, 1127, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil Porangabussu, Fax: +55 85 3366 8333, e-mail: vietrao@ufc.br

² Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Piaui, Pi, Teresina, Brazil

Received 21 March 2007; revised 22 June 2007; accepted 6 July 2007

Abstract. This study was aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of triterpene α , β -Amyrin in rats on acute phase periodontitis. Periodontitis was induced by ligature placement around the maxillary right second molar tooth. Rats ($n = 8$ /group) were pretreated with α , β -Amyrin (5 and 10 mg/kg, p.o.), two hours before the induction of periodontal inflammation. Sham-operated and positive controls (lumiracoxib and dexamethasone) were included. Six hours later, plasma levels of TNF-alpha were analysed. Rats were sacrificed at 24h, and the gingival tissue analysed for myeloperoxidase (MPO) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), as measures of neutrophil influx and lipid-peroxidation, respectively α , β -Amyrin as well as dexamethasone significantly inhibited the periodontitis-associated increases of TNF-alpha, and the gingival MPO and TBARS. α , β -Amyrin effect was more prominent at 5 mg/kg. Lumiracoxib manifested varied influence on the studied parameters. These results provide evidence to show that α , β -Amyrin retards acute inflammation in rat model of periodontitis and warrant further study on its efficacy to prevent chronic periodontitis-associated bone loss.

Key words: α , β -Amyrin; Triterpene; Acute phase periodontitis; TNF-alpha; MPO and TBARS; Anti-inflammatory activity

Introduction

Periodontitis is a destructive inflammatory disorder of periodontium associated with accumulation of plaque that may initiate a local inflammatory reaction and long-term plaque persistence induces chronic inflammation of the periodontal

tissues leading to alveolar bone resorption and tooth loss (Pihlstrom et al., 2005; Chambrone and Chambrone, 2006; Haynes, 2006). Studies reveal that subjects with stress-related depression and exhaustion will have more plaque accumulation, gingival inflammation, and increased levels of IL-6 and cortisol in gingival crevicular fluid compared to normal controls, suggesting that depression might affect immune function, which could lead to impaired periodontal health (Johannsen et al., 2006). The periodontal diseases are highly prevalent and can affect up to 90% of the worldwide population. Prevention and treatment are aimed at controlling the bacterial biofilm, inflammation and bone loss. Periodontal disease-associated tooth loss may effectively be arrested if proper controls are exercised on bacterial biofilm and transition of inflammation from acute to chronic state. The initial inflammatory reaction involves the edema formation, leukocyte infiltration, and release of inflammatory mediators, setting up gingivitis and there upon the inflammation extends from gingival tissue to adjacent submerged bone and periodontal ligament. Thus progression may modify an initially highly favourable, reversible acute inflammatory state to a less favourable, somewhat irreversible chronic state that promotes tooth loss. COX-2 inhibitors appear promising for control of dental pain and for supportive treatment of inflammatory periodontal diseases. The superior analgesic and sustained efficacy, along with the reduced side effects of COX-2 inhibitors (compared to COX-1 inhibitors) have been revealed in numerous clinical studies, in particular after oral surgery. Moreover, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been used for periodontal therapy, and evidence from animal experiments and clinical trials has documented that NSAIDs either stabilize periodontal conditions by reducing the rate of alveolar bone resorption (Holzhausen et al., 2002; Tschoppe and Kielbassa, 2006) or do not make significant difference (Bissada and Ng, 1998). In contrast, studies involving the use

* Corresponding author

of dexamethasone demonstrated an enhanced alveolar bone loss in rat model of ligature-induced periodontitis (Cavagni et al., 2005). Use of bisphosphonates to prevent bone loss has been found to be associated with osteonecrosis of the jaw (Krueger et al., 2007).

Several Plants have been utilized in popular practice for upkeep of dental health (Noskov, 1966; Darout et al., 2000; Satravaha et al., 2005) and use of herbal extracts as mouth rinses is not uncommon (Pistorius et al., 2003; Botelho et al., 2007). *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., commonly known as almécega, is a widely distributed plant in Amazon and Northeast regions of Brazil. The resin collected from its trunk wood is an effective wound healing agent endowed with anti-inflammatory and analgesic properties (Siani et al., 1999). The major component of the resin is the pentacyclic triterpene α , β -amyrin (an isomeric mixture), and previous studies described its antimicrobial, antidepressant, anti-inflammatory, antinociceptive, and gastroprotective activities (Keterere et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Aragao et al., 2006; Lima-Junior et al., 2006). By virtue of these properties, it is hoped that α , β -amyrin might be an ideal anti-inflammatory agent to halt the progression of periodontitis to chronicity. The present study was therefore aimed to verify its anti-inflammatory potential on the acute phase periodontitis in rats induced by ligature placement around the maxillary right second molar tooth.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 160–200g, obtained from the Central Animal House of the Federal University of Ceara were maintained in temperature-controlled rooms allowing food (Purina Chow) and water *ad libitum*. Surgical procedures and animal treatments were conducted in accordance with the guidelines of the National Institute of Health, Bethesda and the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceara approved the experimental protocols.

Plant material and isolation of α , β -Amyrin

The resinous exudate from the trunk wood of *Protium heptaphyllum* (March.) was collected from the municipal areas of Timon, Maranhão state of Brazil, after its identification by botanist, Prof. Roseli Farias de Melo Barros. A voucher specimen (#18247) has been deposited at the Herbarium Graziela Barroso of the Federal University of Piauí, Teresina, Brazil. The extraction and isolation of α , β -amyrin (Fig. 1) from the crude resin was carried out as described earlier (Viera-Junior et al., 2005) and its structural identity was confirmed by ^1H - and ^{13}C -NMR spectral analysis, based on the method developed by Gallegos and Roque (1990) and in comparison with literature data (Mahato and Sen, 1997).

Induction of Experimental Periodontitis and treatments

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and a sterile nylon 3-0 thread ligature was placed around the cervix of the maxillary left second molar tooth of rats. The ligature was knotted on the buccal side of the tooth, resulting in subgingival position palatally and in supragingival position buccally. Animals in groups ($n = 8$) were treated with α , β -amyrin (5 and 10 mg/kg, p.o.), dexamethasone

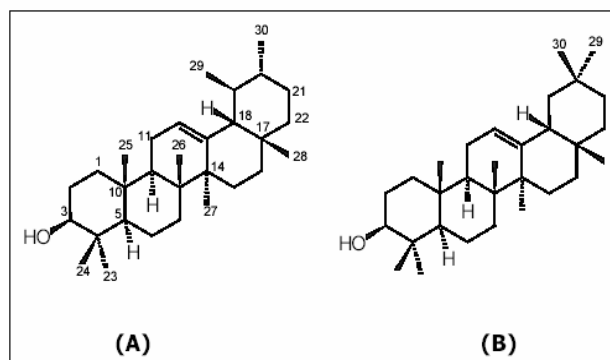


Fig. 1. Chemical structure of α -amyrin (A) and β -amyrin (B).

(1 mg/kg, i.p.), lumiracoxib (20 mg/kg, p.o.), or vehicle (3% Tween 80 in distilled water, 10 ml/kg, p.o.), 2h before the induction of periodontal inflammation. Dose selection for the test drugs was based on our pilot studies. Sham operated animals, which did not receive any medication served as control. Six hours later, blood samples were collected for the analysis of TNF α . At 24h after ligature placement, the animals were sacrificed and the gingival tissue collected to determine the levels of myeloperoxidase activity and thiobarbiturate-reactive substances (TBARS), as measures of neutrophil influx and lipid peroxidation, respectively.

Myeloperoxidase (MPO) activity

The myeloperoxidase (MPO) activity, an indicator of polymorphonuclear leukocyte in the gingival tissue of rats that received different treatments was determined according to a previously described method (Krawisz et al., 1984). The buccal gingiva surrounding the upper left molars were removed and stored at -70°C . Gingival tissue (50 mg) was pulverized and homogenized in 50mM of phosphate buffer (pH 6), containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). The samples were freeze-thawed thrice with sonication between cycles and then the samples were centrifuged at 5,000 rpm for 15 min. Aliquots of supernatant (0.1 ml) were added to 2.9 ml of reaction mixture containing 0.167 mg/ml of *o*-dianisidine, and 0.0005% H_2O_2 solution, which were prepared in 50mM of phosphate buffer. The resulting change in absorbance at 460 nm was measured spectrophotometrically, for 5 min. One unit of MPO activity was defined as that degrading

1 μmol of peroxide per min at 25°C . The activity was expressed in units per mg of tissue (U/mg tissue).

Measurement of TBARS

The thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were measured as a marker of lipidperoxidation by a previously described method (Ohkawa et al., 1979). In brief, 0.25 ml of 5% gingival tissue homogenate prepared in 0.9% NaCl was added to 0.4 ml of 35% perchloric acid and centrifuged at 1,400g for 10 min. To the supernatant solution, 200 μL of 1.2% thiobarbituric acid solution was added and the mixture was then placed in a water bath and heated for 30 min at 95 – 100°C . After cooling, the absorbance was measured with a microplate reader at a wavelength of 535 nm.

TNF alpha assay

TNF- α levels in plasma was determined by ELISA using commercial kit (Amersham, UK) and the results were expressed in pg/ml. Detection limits for TNF- α were 10 pg/ml.

Statistical analysis

The results were presented as the mean \pm SEM, and were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test for comparisons between individual groups. A probability value of less than 0.05 ($p < 0.05$) was considered significant.

Results and discussion

This study sought to verify the anti-inflammatory potential of a naturally occurring triterpene α , β -amyrin in the rat model of ligature-induced periodontitis on its acute stage. Its efficacy was analysed on myeloperoxidase activity (MPO), an index of neutrophil influx and TBARS formation, the product of lipid peroxidation in ligature affected gingival tissue, as well as on 6-hour increase in plasma levels of TNF- α , the key proinflammatory cytokine. At 24h after ligature placement, MPO activity in gingival tissue was significantly enhanced when compared to Sham operated controls (Fig. 2) obviously due to increased influx of inflammatory neutrophils. In animal groups pretreated with 5 and 10 mg/kg α , β -amyrin or 1 mg/kg dexamethasone, the measured levels of MPO activity were significantly low when compared to vehicle-treated controls, but however, were not different from the values obtained in Sham operated controls. Significant inhibition of MPO by α , β -amyrin may be beneficial in arresting the periodontitis progression. Although lumiracoxib, the COX-2 inhibitor showed a tendency to inhibit MPO activity, its effect was statistically non-significant. COX-2 is induced after cellular activation by inflammatory cytokines and its inhibition may be useful in helping to control gingival

fibroblast production, which is greatly influenced by bone resorbing cytokine IL-6 (Tipton et al., 2003). Several data in literature provide evidence that systemic therapy with COX-2 inhibitors such as meloxicam and etorocoxib can retard the progression of experimentally induced periodontitis in rats during the initial experimental period and also retard bone resorption at a later stage (Holzhausen et al., 2005; Nassar et al., 2005). It remains to be seen in a future study whether or not α , β -amyrin blocks bone resorption in the chronic phase of periodontitis.

The thiobarbituric acid- reactive substances (TBARS) assay is a commonly applied test to measure free radical activity (Tuter et al., 2001). In this assay, thiobarbituric acid reacts with aldehydes such as malondialdehyde yielding TBARS, and the measurement of TBARS is a useful indice of oxidative deterioration. An increased level of lipid peroxidation may play a role in the inflammation and destruction of the periodontium in periodontitis. The periodontitis sufferers show a significantly higher TBARS level than the healthy subjects (Panjamurthy et al., 2005) and suggest that gingival tissue TBARS are closely associated with periodontal status and their measurement may be a valuable guide in treating and monitoring periodontal disease progression. In the present study, both α , β -amyrin and dexamethasone were able to significantly decrease the periodontitis associated increase in TBARS formation (Fig. 3). Thus α , β -amyrin may have a potential applicability in treating and monitoring periodontal disease progression.

To study the possible role of TNF- α in the development of ligature-induced periodontitis, ELISA was performed to register plasma levels of TNF- α . The results show a significant elevation in plasma TNF- α in vehicle-treated control

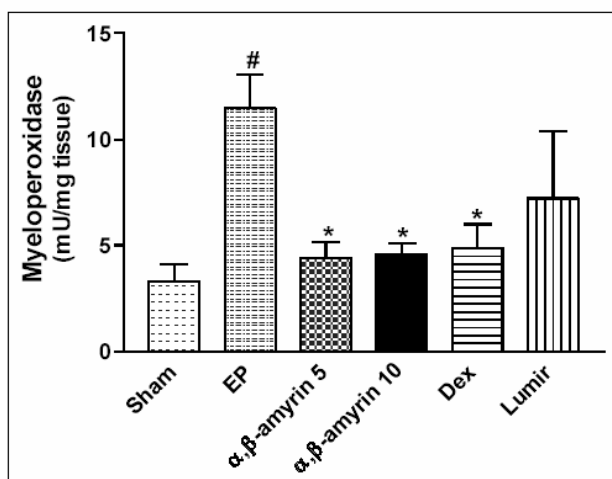


Fig. 2. Effects of α , β -amyrin, dexamethasone and lumiracoxib on gingival myeloperoxidase activity in rats on ligature-induced acute phase periodontitis. Vehicle (EP-experimental periodontitis; 3% Tween 80, 10 ml/kg), α , β -Amyrin (5, and 10 mg/kg, p.o.), dexamethasone (Dex, 1 mg/kg, i.p.) or lumiracoxib (Lumir, 20 mg/kg, p.o.) were administered 2h before the induction of periodontitis. Sham control (Sham) was untreated. Gingival tissue was collected at 24h following the ligature placement and analysed for myeloperoxidase. Bars represent mean \pm S.E.M. # $p < 0.05$ vs. Sham; was considered significantly different compared to naive group. * $p < 0.05$ vs. EP (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

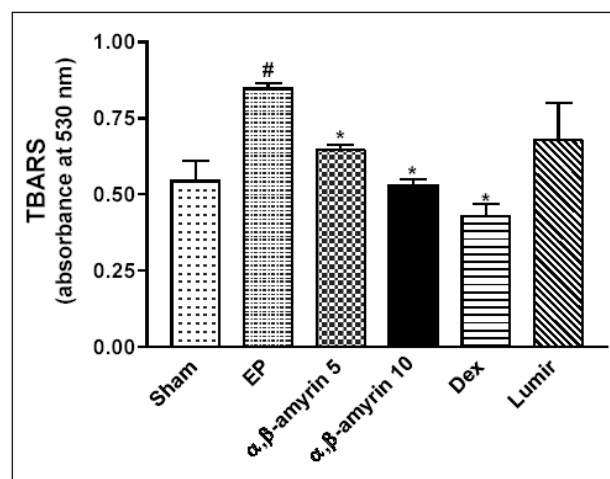


Fig. 3. Effects of α , β -amyrin, dexamethasone and lumiracoxib on gingival TBARS in rats on ligature-induced acute phase periodontitis. Vehicle (EP- experimental periodontitis, 3% Tween 80, 10 ml/kg), α , β -Amyrin (5, and 10 mg/kg, p.o.), dexamethasone (Dex, 1 mg/kg, i.p.) or lumiracoxib (Lumir, 20 mg/kg, p.o.) were administered 2h before the induction of periodontitis. Sham control (Sham) was untreated. Gingival tissue was collected at 24h following the ligature placement and analysed for thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Bars represent mean \pm S.E.M. # $p < 0.05$ vs. Sham; was considered significantly different compared to naive group. * $p < 0.05$ vs. EP (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

rats, when compared to Sham control (Fig. 4). Amongst the drug treatments, groups treated with α , β -amyrin (5 mg/kg) and dexamethasone but not the COX-2 inhibitor, lumiracoxib showed significant reductions in plasma levels of TNF- α . These observations were in agreement with the recent finding on etanercept, a tumour necrosis factor antagonist with anti-inflammatory effects that showed a reduced degree of periodontitis-associated tissue injury (Di Paola et al. 2007). This suggests that α , β -amyrin might be acting as an anti-inflammatory agent via suppression of TNF- α release or its proinflammatory action. However, in these studies etanercept was post-treated (i.e. after ligature placement) to show a therapeutic response whereas in our study, the test drugs were given as pretreatments, i.e. administered to animals before the ligature placement, with an objective to verify whether or not α , β -amyrin would modify the acute phase inflammation in experimental periodontitis.

The natural triterpene α , β -amyrin used for the study is an isomeric mixture resembling chemical structures of ursolic and oleanolic acids in the proportion of 67:33 (Vieira-Junior et al., 2005). It has recently been shown that ursolic acid and oleanolic acids inhibit Inhibitory-Kappa β kinase and p65 phosphorylation, leading to suppression of NF-kappa β activation (Shishodia et al., 2003). Possibly by structural identity, α , β -amyrin is likely to possess these properties and able to modulate the NF-Kappa β -activation involved increase in proinflammatory cytokines such as TNF- α . Like ursolic and oleanolic acids, α , β -amyrin demonstrated, gastroprotective, hepatoprotective, anti-inflammatory, and antinociceptive effects (Oliveira et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

It has been constantly observed that topical treatment reduces gingivitis while systemic treatment prevents alveolar

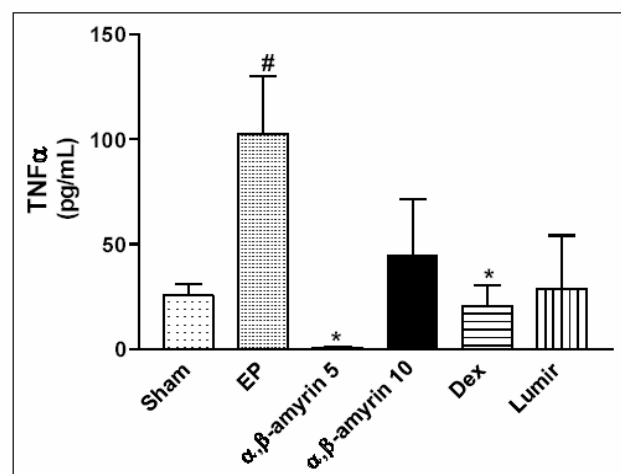


Fig. 4. Effects of α , β -amyrin, dexamethasone and lumiracoxib on plasma TNF- α levels in rats on ligature-induced acute phase periodontitis. Vehicle (Oper-experimental periodontitis; 3% Tween 80, 10 ml/kg), α , β -Amyrin (5, and 10 mg/kg, p.o.), dexamethasone (Dex, 1 mg/kg, i.p.) or lumiracoxib (Lumir, 20 mg/kg, p.o.) were administered 2h before the induction of periodontitis. Sham control (Sham) was untreated. Blood samples were collected at 6h following the ligature placement and analysed for plasma TNF- α . Bars represent mean \pm S.E.M. # p < 0.05 vs. Sham; was considered significantly different compared to naive group. * p < 0.05 vs. EP (ANOVA followed by Newman-Keuls test).

bone loss (Xu and Wei, 2006). The development of topical formulations (e.g. gels, toothpastes, rinses) with a daily application may be of particular interest as this may help to reduce if any adverse systemic effects in the long-term use. Future studies should address the potential benefits of using α , β -amyrin as a topical anti-inflammatory agent in periodontitis-related disorders.

In conclusion, our findings demonstrate for the first time that α , β -amyrin modulates acute periodontal inflammation by reducing neutrophil infiltration, oxidative stress and the production of proinflammatory cytokine TNF- α , and suggest that it might be useful as a therapeutic agent for the treatment of gingivitis and to retard the periodontitis disease progression.

Acknowledgements. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Brazil (Proc. No. 472717/2003-0, 475143/2004-3; 503961/2004-3; 501179/2005-4). We thank Mrs. Dannyella Marques Ferreira for the technical assistance.

References

- Aragao, G. F., Carneiro, L. M., Junior, A. P., et al. (2006). A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **85**, 827–34.
- Bissada, N. F. and Ng, V. W. (1998). Clinical evaluation of systemic doxycycline and ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis, *J. Periodontol.* **69**, 772–6.
- Botelho, M. A., Nogueira, N. A. P., Bastos, G. M., et al. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 349–56.
- Cavagni, J., Soletti, A. C., Gaio, E. J., et al. (2005). The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats, *Braz. Oral Res.* **19**, 290–4.
- Chambrone, L. A. and Chambrone, L. (2006). Tooth loss in well-maintained patients with chronic periodontitis during long-term supportive therapy in Brazil, *J. Clin. Periodontol.* **33**, 759–64.
- Darout, I. A., Albander, J. M. and Skaug, N. (2000). Periodontal status of adult Sudanese habitual users of miswak chewing sticks or tooth brushes, *Acta Odontol. Scand.* **58**, 25–30.
- Di Paola, R., Mazzon, E., Muia, C., et al., Effects of etanercept, a tumor necrosis-alpha antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats, *Br. J. Pharmacol.* **150**, 286–97.
- Gallegos, R. S. and Roque, N. E. (1990). Analise de misturas de triterpenos por ^{13}C NMR, *Química. Nova* **13**, 278–81.
- Haynes, D. R. (2006). Emerging and future therapies for the treatment of bone loss associated with chronic inflammation, *Inflammopharmacology* **14**, 193–7.
- Holzhausen, M., Rossa Junior, C., Marcantonio Junior E., et al. (2002). Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats, *J. Periodontol.* **73**, 1030–6.
- Holzhausen, M., Spolidorio, D. M., Muscara, M. N., et al. (2005). Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats, *J. Periodontol. Res.* **40**, 208–11.
- Johannsen, A., Rylander, G., Soder, B., et al. (2006). Dental plaque, gingival inflammation, and elevated levels of interleukin-6 and cortisol in gingival crevicular fluid from women with stress-related depression and exhaustion, *J. Periodontol.* **77**, 1403–9.
- Katerere, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., et al. (2003). Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae, *Phytochemistry* **63**, 81–8.

- Krawisz, J. E., Sharon, P. and Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models, *Gastroenterology* **87**, 1344–50.
- Krueger, C. D., West, P. M., Sargent, M., et al. (2007). Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw, *Ann. Pharmacother* **41**, 276–84.
- Lima-Júnior, R. C. P., Oliveira, F. A., Gurgel, L. A., et al. (2006). Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta- amyryn, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice, *Planta. Med* **72**, 34–9.
- Mahato, S. B. and Sen, S. (1997). Advances in triterpenoid research. 1990–1994, *Phytochemistry* **44**, 1165–236.
- Nassar, A., Nassar, P., Nassar, P. M., et al. (2005). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption, *Pesqui Odontol Brás* **19**, 36–40.
- Noskov, A. D. (1966). The treatment of periodontosis by injections of aloe extract and their influence on the phosphorus-calcium metabolism, *Stomatologia* **45**, 13–5.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem* **95**, 351–8.
- Oliveira, F. A., Vieira-Júnior, G. M., Chaves, M. H., et al. (2004). Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyryn from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons, *Planta. Med* **70**, 780–2.
- Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R., et al. (2005). Protective effect of alpha-and beta-amyryn, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice, *J. Ethnopharmacol* **98**, 103–8.
- Panjamurthy, K., Manoharan, S., Ramachandran, C. R. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis, *Cell. Mol. Biol. Lett* **10**, 255–64.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. and Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases, *Lancet* **366**, 1809–20.
- Pistorius, A., Willershausen, B., Steinmeier et al. (2003). Efficacy of subgingival irrigation using herbal extracts on gingival inflammation, *J. Periodontol* **74**, 616–22.
- Sastravaha, G., Gassmann, G., Sangtherapytikul, P., et al. (2005). Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy, *J Int Acad Periodontol* **7**, 70–9.
- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., et al. (2003). Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1, *Cancer. Res* **63**, 4375–83.
- Siani, A. C., Ramos, M. F. S., de Lima, M. O., et al. (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*, *J. Ethnopharmacol* **66**, 57–69.
- Tschoppe, P. and Kielbassa, A. M. (2006). The role of COX-2 in dentistry. Past or future? *Schweiz Monatsschr Zahnmed* **116**, 880–6.
- Tuter, G., Kurtis, B. and Serdar, M. (2001). Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase 1 periodontal therapy in patients with chronic periodontitis, *J. Periodontol* **72**, 883–8.
- Tipton, D. A., Flynn, J. C., Stein, S. H., et al. (2003). Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1beta-stimulated prostaglandin E2 and IL-6 production by human gingival fibroblasts, *J. Periodontol* **74**, 1754–63.
- Vieira-Junior, G. M., Souza, C. M. L. and Chaves, M. H. (2005). Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas, *Química. Nova* **28**, 183–7.
- Xu, Y. and Wei, W. (2006). A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats, *Arch Oral Biol* **51**, 794–803.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/IP>



Antinoceptive effect of triterpenoid α,β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin

S.A. Holanda Pinto^a, L.M.S. Pinto^a, M.A. Guedes^a, G.M.A. Cunha^a, M.H. Chaves^b, F.A. Santos^a, V.S. Rao^{a,*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Post-Graduation Programme in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, POB 3157, Rua Cel Nunes de Melo-1127, Porangabussu, 60430-270 Fortaleza, Ceara, Brazil

^bDepartment of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Piaui, Teresina, Piaui, Brazil

Abstract

The effects of α,β -amyrin, a pentacyclic triterpene isolated from *Protium heptaphyllum* was investigated on rat model of orofacial pain induced by formalin or capsaicin. Rats were pretreated with α,β -amyrin (10, 30, and 100 mg/kg, i.p.), morphine (5 mg/kg, s.c.) or vehicle (3% Tween 80), before formalin (20 μ l, 1.5%) or capsaicin (20 μ l, 1.5 μ g) injection into the right vibrissa. In vehicle-treated controls, formalin induced a biphasic nociceptive face-rubbing behavioral response with an early first phase (0–5 min) and a late second phase (10–20 min) appearance, whereas capsaicin produced an immediate face-rubbing (grooming) behavior that was maximal at 10–20 min. Treatment with α,β -amyrin or morphine significantly inhibited the face-rubbing response in both test models. While morphine produced significant antinociception in both phases of formalin test, α,β -amyrin inhibited only the second phase response, more prominently at 30 mg/kg, in a naloxone-sensitive manner. In contrast, α,β -amyrin produced much greater antinociceptive effect at 100 mg/kg in the capsaicin test, which was also naloxone-sensitive. These results provide first time evidence to show that α,β -amyrin attenuates orofacial pain atleast, in part, through a peripheral opioid mechanism but warrants further detailed study for its utility in painful orofacial pathologies.

© 2007 Published by Elsevier GmbH.

Keywords: *Protium heptaphyllum*; α,β -Amyrin; Antinociception; Orofacial pain; Formalin; Capsaicin

Introduction

Orofacial pain is a common complaint patients seek medical or dental care. Orofacial pain is frequent with a high prevalence in temporomandibular and dental disorders, malignant diseases, and in chemo-radiotherapy-surgery-associated mucositis and neurotoxicity (Benoliel et al., 2007; Epstein et al., 2007). A wide

variety of drugs are indicated for treating orofacial pain, which include NSAIDs, muscle relaxants, opioids and antidepressants but side effects and toxicity are apparent with long-term administration (Dionne, 2001). In recent years, there has been a constant search for alternative drugs that possess greater efficacy and safety in reducing the inflammatory and neuropathic pain and with a strategy to halt the transition from acute to pain chronicity.

Protium heptaphyllum (Aubl.) March., commonly known as almécega, is a widely distributed plant in the Amazon and in Northeast of Brazil. The resin collected from its trunk wood is an effective healing agent of

*Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 8341;

fax: +55 85 3366 8333.

E-mail addresses: vietrao@ufc.br, viet_rao@yahoo.com.br (V.S. Rao).

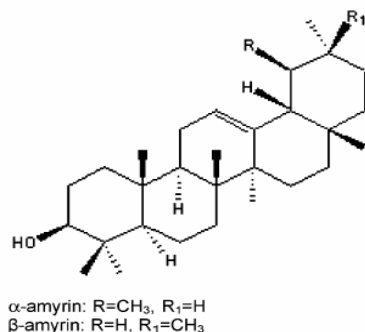


Fig. 1. Chemical structure of α,β -amyrin.

wounds with anti-inflammatory and analgesic properties (Siani et al., 1999). The major component of the resin is the pentacyclic triterpene α,β -amyrin (an isomeric mixture) (Fig. 1), and previous studies described its antimicrobial, anti-inflammatory, gastroprotective and antinociceptive properties (Katerere et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Lima-Júnior et al., 2007). By virtue of these properties, it is hoped that α,β -amyrin might be an ideal agent to combat orofacial pain and to prove it, the present study investigated its antinociceptive potential in the test models of orofacial pain induced by formalin and capsaicin in rats.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed on male Wistar rats (160–200 g), housed in standard conditions (12-h light/dark cycle and $22 \pm 2^\circ\text{C}$) and had free access to food and water except during the test period. All behavioral tests were carried out between 11:00 and 16:00 h. Animal experiments were conducted in accordance with the guidelines of International Association for the study of pain and the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceara approved the experimental protocols.

Plant material and isolation of α,β -Amyrin

The resinous exudate from the trunk wood of *Protium heptaphyllum* (March.) was collected from the municipal areas of Timon, Maranhão state of Brazil, after its identification by botanist Prof. Roseli Farias de Melo Barros. A voucher sample (#18247) has been deposited at the Herbarium Graziela Barroso of the Federal University of Piauí, Teresina, Brazil. The extraction and isolation of α,β -amyrin (**1**) from the crude resin

was carried out as described earlier (Vieira-Junior et al., 2005) and its structural identity was confirmed by ¹H- and ¹³C-NMR spectral analysis, based on the method developed by Gallegos and Roque (1990) and in comparison with literature data (Mahato and Sen, 1997).

Formalin test

Orofacial nociception was induced in rats by s.c. injection of 20 μl of 1.5% formalin into the right vibrissa pad, using a 27-gauge needle (Clavelou et al., 1995). This volume and percentage concentration of formalin was selected from our pilot studies that showed a pain-related biphasic behavioral response (face-rubbing) of greater intensity at the periods of 0–5 min (first phase) and 10–15 min (second phase), following its injection into vibrissa pad. Pain was quantified at these time periods by measuring the time (s) that the animals spent face-rubbing in the injected area with its fore- or hindpaws. To assess the effects of test drugs, rats in groups ($n = 8$) were pretreated systemically with vehicle (3% Tween 80 in distilled water, the solvent for α,β -amyrin), α,β -amyrin (10, 30, and 100 mg/kg, i.p.), 2 h before the local injection of formalin. Morphine (5 mg/kg, s.c.), administered 30 min before the algogen was included as positive control. In separate experiments, the possible involvement of opioid mechanism was assessed in the antinociception produced by α,β -amyrin or morphine with naloxone (2 mg/kg, i.p.), an opioid antagonist, injected simultaneously.

Capsaicin test

The orofacial pain was induced by capsaicin in rats as described earlier (Pellisier et al., 2002). Rats ($n = 8$) were injected with capsaicin (20 μl , 1.5 μg) subcutaneously into the right vibrissa pad, using a 27 gauge needle. Capsaicin was dissolved in ethanol, dimethyl sulfoxide and distilled water (1:1:8). In pilot studies, rats manifested pain-related face-rubbing/grooming behavior immediately following the injection of capsaicin with a higher intensity at 10–20 min period. Therefore, pain quantification was performed at this time period by measuring the time (s) that the animals spent face-rubbing/grooming the injected area with the fore- or hindpaws. The α,β -amyrin or vehicle were given to animals as described for formalin test, 2 h before the local injection of capsaicin. Morphine (5 mg/kg, s.c.), administered 30 min before the algogen was included as a positive control. To test the possible involvement of opioid mechanism in the antinociception produced by α,β -amyrin or morphine, animals were simultaneously pretreated with the opioid antagonist, naloxone (2 mg/kg, i.p.).

Statistical analysis

The results were presented as the mean \pm SEM, and were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keuls *post-hoc* test for multiple comparisons between individual groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The results show that pretreatment with α, β -amyrin produces pronounced antinociception as evidenced by decreased face rubbing behavior in capsaicin test and in the second phase of formalin test (Figs. 2 and 3). Algesic effects in both models are said to be due to liberation of mediator substances like sensory neuropeptides and prostaglandins (Henry et al., 1999; Sandor et al., 2007). In formalin-induced orofacial pain, the first phase response (0–5 min) corresponds to acute neurogenic pain sensitive to drugs that interact with opioid system and the second phase response (10–20 min) corresponds to inflammatory pain that can be inhibited by cyclooxygenase inhibitors. Drugs that act primarily as central analgesics could inhibit both phases while peripherally acting drugs inhibit only the second phase algesia (Roseland et al., 1990).

It was observed that α, β -amyrin was unable to suppress the first phase nociceptive behavior in formalin test (Fig. 2A), while the second phase was inhibited possibly acting via suppression of arachidonate cascade. Consistent with this finding was the observation that systemic administration of ketorolac or diclofenac (10 and 30 mg/kg, i.p.) significantly attenuates formalin-induced nociceptive behaviour in the second phase only (Padi et al., 2006). These results indicate that Prostaglandins (PGs), particularly peripheral PGs are involved in nociceptive behaviour following formalin injection into the vibrissa pad.

The opioids can produce analgesia through peripheral mechanisms in formalin test (Stein et al., 2001), consistent with the observations of Shannon and Lutz (2002) with subcutaneous loperamide, a peripherally acting μ -opioid agonist. Peripheral opioid analgesia is undoubtedly of clinical relevance, especially considering that systemic opioid therapy often is hampered by central side effects. α, β -amyrin lacks analgesic action in tests of tail-flick and hot-plate suggesting no central analgesia (Otuki et al., 2005), but interestingly, it displays peripheral analgesia by a naloxone-sensitive mechanism (Fig. 2B) suggesting that it might even have a direct action on the opioid receptor, which needs to be clarified in a future study.

α, β -amyrin inhibits the neurogenic inflammatory pain induced by capsaicin injection into the vibrissa pad, as evidenced by naloxone-reversible suppression of facial grooming (Fig. 3). The inhibitory effect observed with

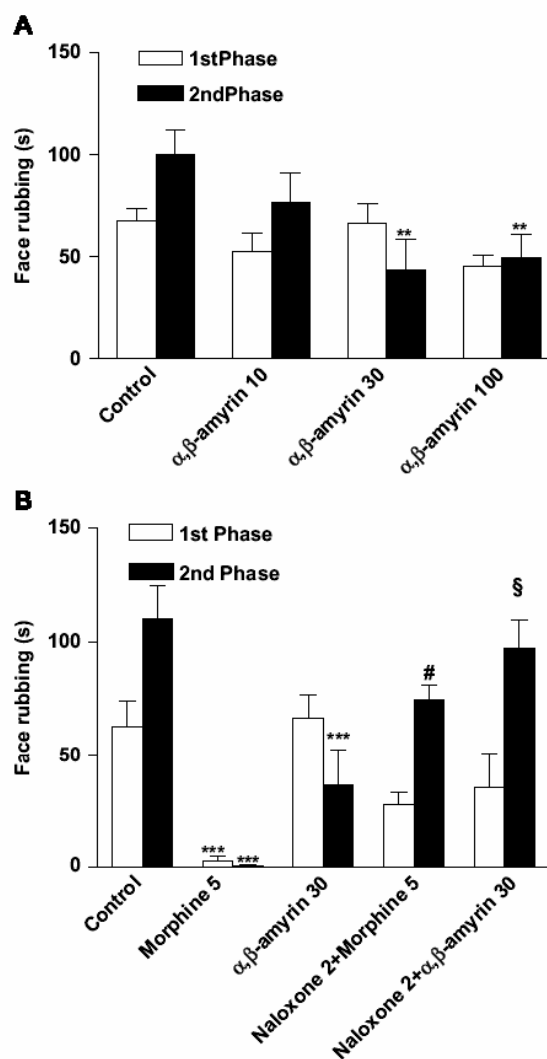


Fig. 2. (A) Effect of α, β -amyrin on formalin-induced orofacial pain-related face-rubbing response in rats. Vehicle or α, β -amyrin was administered 2 h before formalin injection into the vibrissa pad. (B) The effect of morphine and/or naloxone pretreatments on the antinociceptive effects of α, β -amyrin. Morphine or naloxone was injected 30 min before formalin. Each value represents the mean \pm s.e.m of 8 animals. *** $p < 0.001$ compared to control. ### $p < 0.01$ compared to morphine alone and \$ $p < 0.01$ compared with α, β -amyrin (ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

α, β -amyrin on capsaicin- and in the second phase of formalin-induced facial grooming may be a result of its possible inhibition on Substance P release or due to a direct blocking action on its receptor neurokinin-1 (NK-1). In this context, a previous study provided evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the rat and systemically administered NK-1 receptor antagonist SR14033 blocks only the second phase of the orofacial

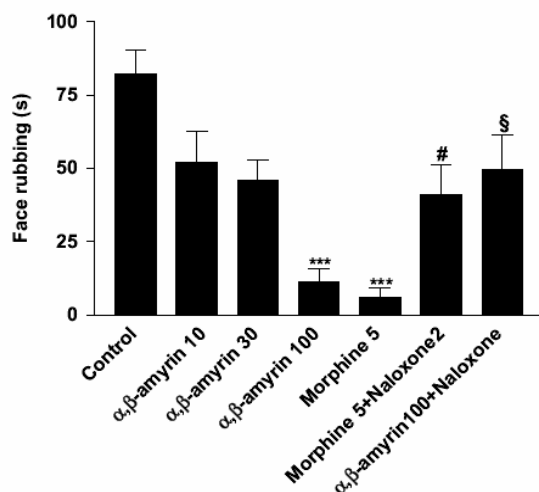


Fig. 3. Effect of α,β -amyrin on capsaicin-induced orofacial pain-related face-rubbing response in rats. Vehicle or α,β -amyrin was administered 2 h before capsaicin injection into the vibrissa pad whereas morphine and or naloxone were injected 30 min before the capsaicin. Each value represents the mean \pm s.e.m of 8 animals. *** $p < 0.001$ compared to control. ## $p < 0.01$ compared with morphine alone and \$ $p < 0.01$ compared with α,β -amyrin (ANOVA followed by Student Newman-Keuls test).

formalin test (Henry et al., 1999; Luccarini et al., 2003). In a more recent study, we have shown the decreased NK-1 immunoreactivity in animals treated with α,β -amyrin in the rat model of visceral nociception induced by cyclophosphamide (Lima-Júnior et al., 2007). At the doses tested, α,β -amyrin lacks overt toxicity and no sedative or motor impairment effects in rodent species (Lima-Júnior et al., 2007).

In conclusion, this study demonstrates that α,β -amyrin modulates neuropathic and inflammatory pain in the test models of orofacial pain induced by capsaicin and formalin through a naloxone-sensitive mechanism. The results also support the clinical use of peripheral opioids to combat orofacial pain and further suggest that α,β -amyrin has a therapeutic potential for painful facial and dental disorders.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq and CAPES, Brazil. We thank Mrs. Dannyella Marques Ferreira for the technical assistance.

References

- Benoliel, R., Epstein, J., Eliav, E., Jurevic, R., Elad, S., 2007. Orofacial pain in cancer: part I – mechanisms. *J. Dental Res.* 86, 491–505.
- Clavelou, P., Dallel, R., Orliaguel, T., Wods, A., Raboisson, P., 1995. The orofacial formalin test in rats: effect of different formalin concentrations. *Pain* 62, 295–301.
- Dionne, R.A., 2001. Pharmacologic advances in orofacial pain: from molecules to medicine. *J. Dental Edu.* 65, 1393–1403.
- Epstein, J.B., Elad, S., Eliav, E., Jurevic, R., Benoliel, R., 2007. Orofacial pain in cancer: part II – clinical perspectives and management. *J. Dental Res.* 86, 506–518.
- Gallegos, R.S., Roque, N.E., 1990. Analise de misturas de triterpenos por ^{13}C NMR. *Quím. Nova.* 13, 278–281.
- Henry, J.L., Yashpal, K., Pitcher, G.M., Chabot, J.G., Coderre, T.J., 1999. An evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the rat. *J. Neurosci.* 19, 6588–6598.
- Katerere, D.R., Gray, A.I., Nash, R., Waigh, R.D., 2003. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry* 63, 81–88.
- Lima-Júnior, R.C.P., Sousa, D.I.M., Brito, G.A.C., Cunha, G.M., Chaves, M.H., Rao, V.S.N., Santos, F.A., 2007. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α,β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K + ATP channels. *Inflamm. Res.* 56, 1–8.
- Luccarini, P., Henry, M., Alvarez, Gaydier, A.M., Dallel, R., 2003. Contribution of neurokinin 1 receptors in the cutaneous orofacial cutaneous pain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 368, 320–323.
- Mahato, S.B., Sen, S., 1997. Advances in triterpenoid research. 1990–1994. *Phytochemistry* 44, 1165–1236.
- Oliveira, F.A., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Lima, R.C., Silva, R.M., Maia, J.L., Brito, G.A., Santos, F.A., Rao, V.S., 2005. Protective effect of alpha-and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 98, 103–108.
- Otuki, M.F., Ferreira, J., Lima, F.V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L.A., Cani, G.S., Santos, A.R., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 310–318.
- Pellissier, T., Pajot, J., Dallel, R., 2002. The orofacial capsaicin test in rats. Effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96, 81–87.
- Padi, S.S., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K., 2006. Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial area of rats. *Inflammopharmacology* 14, 57–61.
- Roseland, J.H., Tjolsen, A., Moele, B., Hole, K., 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42, 235–242.
- Sandor, K., Helyes, Z., Gyires, K., Szolcsányi, J., László, J., 2007. Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sci.* 81, 97–102.
- Shannon, H.E., Lutz, E.A., 2002. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 42, 253–261.

- Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de -Lima, O., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez-Ferreira, E., Soares, R.O., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimarães, A.C., Zoghbi, M.G., Henriques, M.G., 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* 66, 57–69.
- Stein, C., Machelska, H., Binder, W., Schäfer, M., 2001. Peripheral opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 62–65.
- Vieira-Junior, G.M., Souza, C.M.L., Chaves, M.H., 2005. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quím. Nova* 28, 183–187.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)