ALLIETE MATILDE VICELLI LODDI

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DA *Malva sylvestris* Linn. EM ALTERAÇÕES BUCAIS

CURITIBA

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ALLIETE MATILDE VICELLI LODDI

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DA *Malva sylvestris* Linn. EM ALTERAÇÕES BUCAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Otuki
Co-Orientadora: Prof[a] Dr[a] Daniela de Almeida Cabrini

CURITIBA

2008

Tenha sempre em mente que a pele enruga, o cabelo embranquece e os dias convertem-se em anos...
Mas o que é importante não muda.
A sua força e convicção não tem idade.
O seu espírito é como qualquer teia de aranha.
Atrás de cada linha de chegada há sempre uma de partida.
Atrás de cada conquista, vem um novo desafio.
Enquanto estiver viva, sinta-se viva...
Se sentir saudades do que fazia volte a fazer.
Não viva de fotografias amarelecidas...
Continue quando todos esperam que desista.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, caminhe!
Quando não conseguir caminhar use uma bengala...
Mas nunca se deixe deter...

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, que esteve comigo em todos os momentos. Nos alegres e principalmente nos mais difíceis. Também agradeço a Ele ter me colocado em uma família onde o estudo sempre foi fundamental e incentivado.

Agradeço sempre a minha família. Aos meus pais, Evelane e Antonio, pelo incentivo e esforço ao longo dos anos para que eu estudasse e sempre continuasse nesta vida acadêmica.

Agradeço muito ao meu marido, Tarcisio, pois sem seu apoio emocional e financeiro, este momento não teria acontecido. As noites de estudo, seminários, finais de semana sem sair de casa, apesar do maior sol... Agora vai ser a sua vez e estarei junto com você sempre.

Minha querida amiga Valéria, você que me incentivou tanto a fazer mestrado e foi compreensiva quando deixei o consultório para me dedicar somente ao Mestrado, um muito obrigada!!!

Agradeço ao meu orientador Professor Michel Otuki, pelas idéias, incentivo e confiança, procurando sempre o melhor para o desenvolvimento do trabalho.

Um agradecimento especial à Professora Daniela Cabrini. Obrigada por estar sempre me apoiando e co-orientando, tanto nas discussões de experimentos, compra de material, qualificação, no incentivo à leitura...

Agradeço muito ao Professor Fábio André dos Santos, que participou como meu co-orientador também, e à Márcia Thaís Pochapski. Obrigada pela disponibilidade constante, pela ajuda em todos os momentos, inclusive feriados, finais de semana e aniversários (16/12/07). Sem a ajuda de vocês, com certeza, seria muito mais difícil realizar este trabalho e ele provavelmente não ficaria do jeito que ficou.

Minhas amigas queridas do laboratório, agora amigas pra a vida toda, Laryssa, Evelise, Cíntia (Quarteto Fantástico), Shirley e Renata; como agradecer todo o apoio e incentivo? Ouvintes interessadas e compreensivas, só vocês entendiam os experimentos que não deram certo, extrato que acaba, resultados inesperados, animais que não respondem, crises existencialmente acadêmicas, medos do futuro!

Obrigada aos amigos do laboratório, com alguns tive mais contato, com outros menos, mas todos foram importantes: Daniel, Arthur, Bruno e Fran.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Farmacologia. Aos funcionários, secretárias, técnicos, zeladoras e aos funcionários do Biotério.

Agradeço também aos colegas do Mestrado que de alguma forma ou outra contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Senhor Herculano (NINO) pela ajuda e disponibilidade para passar, ao menos um pouquinho, de todo seu imenso conhecimento do mundo da Histologia.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e à Universidade Estadual de Ponta Grossa.

RESUMO

A inflamação é uma resposta de proteção do organismo a uma agente agressor, cujo objetivo é limitar ou destruir esse agente. O periodonto, como parte integrante do organismo está sujeito a sofrer alterações inflamatórias. Ele é a unidade formada pela gengiva, osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular. A partir da susceptibilidade do indivíduo, seguindo-se de acúmulo de placa bacteriana, as alterações inflamatórias se manifestam na forma inicial de gengivite, podendo ou não evoluir para uma periodontite. A doença periodontal é de difícil tratamento, por se tratar de vários microrganismos envolvidos, em sua etiologia. Além dos diversos agentes quimioterápicos, estudos têm sido realizados para se verificar a ação de determinados produtos naturais. Uma das plantas que, de certa forma, é muito recomendada e utilizada por indivíduos com problemas bucais, mas de forma empírica, é a *Malva sylvestris* L. A partir dos resultados obtidos sobre a ação antiinflamatória da *M. sylvestris*, em doença periodontal induzida por ligadura, tornou-se de interesse para o trabalho avaliar também o processo de cicatrização da planta em lesão palatina de ratos. Os resultados obtidos nos mostraram que a *M. sylvestris,* na dose de 25 mg/dente reduziu a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e NAG, também houve redução da reabsorção óssea e aumento do percentual ósseo periodontal. A planta também se apresentou eficaz, *in vitro*, na redução da liberação de óxido nítrico (NO) por fibroblastos gengivais estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Na dose de 50 mg/lesão reduziu a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e NAG, e também o tempo de cicatrização. A partir desses resultados sugere-se que a *M. sylvestris*, pela ação sinérgica de seus compostos, possui ação antiinflamatória e cicatrizante no tratamento da doença periodontal induzida por ligadura e na cicatrização de lesão palatina, necessitando ainda de mais estudos.

ABSTRACT

Inflammation is a protection response of organism, designed to eradicate irritant agents. The periodontium, part of the masticatory system, as any part of the body is subject to change inflammatory. It is defined as those tissues supporting and investing the tooth, comprises root cementum, periodontal ligament, alveolar bone and gingival. From the susceptibility of the individual, followed by the accumulation of plaque, the periodontium can change inflammatory, which is manifested in the initial form of gingivitis, which may or not evolves into a periodontitis. The periodontal disease is difficult to treat, because it is different microorganisms involved in its etiology. In addition to various chemotherapeutic agents such as antibiotics, non-steroidal antiinflammatory drugs, anti-septic, metal ions and agents oxigenants, studies have been conducted to verify the action of certain natural products. One of the plants that, in a way, it is very recommended and used by individuals with dental problems, but so empirical, is the *Malva sylvestris* L.. From the results obtained on the action of *M. sylvestris*, in periodontal disease induced by ligature, it became of interest to the work also evaluate the healing process of the plant in palate injury of rats. The results showed that *M. sylvestris*, the dose of 25 mg/tooth reduced the activity of enzymes myeloperoxidase (MPO) and NAG, there was also reduction of bone and increasing the percentage periodontal bone. The plant also made effective *in vitro*, in reducing the release of nitric oxide (NO) by gingival fibroblasts stimulated by lipopolissacarídeo (LPS). At the dose of 50 mg/injury reduced the activity of enzymes myeloperoxidase (MPO) and NAG, and also the time for healing. From these results suggest that the *M. sylvestris*, through the synergistic action of its compounds, has anti-inflammatory action and healing in the treatment of periodontal disease induced by ligature and the healing palate, requiring even more studies.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ABREVIATURAS xiii

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Inflamação 15
1.2. Mediadores Inflamatórios 16
1.3. Periodonto 17
1.4. Componentes do Periodonto 18
1.4.1. Gengiva 18
A) Gengiva Livre 19
B) Gengiva Inserida 19
1.4.2. Epitélio Bucal 20
1.4.3. Epitélio Juncional 21
1.4.4. Fluido Gengival 22
1.5. Ligamento Periodontal 23
1.6. Tecido Conjuntivo 23
1.6.1. Células do Tecido Conjuntivo 24
1.7. Matriz 24
1.8. Cemento Radicular 25
1.9. Osso Alveolar 25
1.10. Suprimento Sangüíneo 26
1.11. Sistema Linfático do Periodonto 26
1.12. Inervação do Periodonto 27
1.13. Doenças Periodontais 27
1.13.1. Biofilme Dental 27
1.13.2. Reações ao Biofilme Dental 28
1.14. Mediadores do Processo Inflamatório Periodontal 31
1.14.1. Proteinases 31
1.14.2. Metaloproteinases da Matriz (MMP) 31
1.14.3. Leucócitos Polimorfonucleares (PMN) 32
1.14.4. Citocinas 32
1.14.5. Citocinas Pró-inflamatórias e Antiinflamatórias 33
1.14.6. Quimocinas 33
1.14.7. Prostaglandinas 34
1.14.8. Óxido Nítrico (NO) 34
1.15. Características Clínicas e Histopatológicas da Doença Periodontal 35
A) Gengiva Normal 35
B) Inflamação Gengival 37
1.16. Processos de Defesa do Hospedeiro 43
1.17. Cicatrização em Região de Palato 44

1.18. O uso de Plantas no Desenvolvimento de Medicamentos 48
1.18.1. *Malva sylvestris* Linn 49

2. JUSTIFICATIVA 51

3. OBJETIVOS 52
3.1. OBJETIVO GERAL 52
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52

4. MATERIAIS E MÉTODOS 53
4.1. Materiais 53
4.1.1. Material Vegetal 53
4.1.2. Animais 54
4.2. Métodos 55
4.2.1. Indução da Doença Periodontal com Ligadura 55
4.2.2. Determinação da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO) 57
4.2.3. Determinação da Atividade da Enzima N-acetil-β-D- glucosaminidase (NAG) 57
4.2.4. Verificação da Perda Óssea Periodontal – Exame Morfométrico 58
4.2.5. Análise do Percentual de Suporte Ósseo Periodontal – Exame Radiográfico 58
4.2.6. Cultura de Fibroblastos Gengivais e Quantificação de NO 60
4.2.7. Verificação da Ação Cicatrizante da *Malva sylvestris* 61
4.3. Análise Estatística 63

5. RESULTADOS 64
5.1. Análise Enzimática – MPO- na indução da doença periodontal 65
5.2. Análise Enzimática – NAG - na indução da doença periodontal 68
5.3. Análise Morfométrica 71
5.4. Análise do Percentual de Suporte Ósseo (PSO) 77
5.5. Quantificação *in vitro* de NO 83
5.6. Cicatrização do Palato 86
5.7. Cicatrização em Relação ao Tempo 86
5.8. Aspecto Clínico da Cicatrização 88
5.9. Análise Enzimática – MPO - na cicatrização 89
5.10. Análise Enzimática – NAG - na cicatrização 91

6. DISCUSSÃO 93

7. CONCLUSÃO 104

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático do dente e seu periodonto

Figura 2 Desenho esquemático da gengiva marginal livre, inserida, junção muco gengival e junção esmalte-cemento

Figura 3 *Malva sylvestris* L.

Figura 4 *Malva sylvestris* L.

Figura 5 Demonstração do cálculo de percentual de suporte ósseo periodontal (PSO)

Prancha 1 Procedimentos para realização da ligadura

Prancha 2 Procedimentos para realização de lesão no palato

Prancha 3 Colocação do veículo e gel incorporado com a *Malva sylvestris* sobre a lesão palatina

Prancha 4 Acúmulo de placa bacteriana ao redor da ligadura no primeiro molar inferior em 07 e 15 dias de experimento

Figura 6 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na mieloperoxidase – 07 dias

Figura 7 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na mieloperoxidase – 15 dias

Figura 8 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na mieloperoxidase – 30 dias

Figura 9 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na NAG – 07 dias

Figura 10 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na NAG – 15 dias

Figura 11 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na NAG – 30 dias

Prancha 5 Fotos das mandíbulas mostrando reabsorção óssea e a partir das quais foi realizado o exame morfométrico – 07 dias

Prancha 6 Fotos das mandíbulas mostrando reabsorção óssea e a partir das quais foi realizado o exame morfométrico – 15 dias

Prancha 7 Fotos das mandíbulas mostrando reabsorção óssea e a partir das quais foi realizado o exame morfométrico – 30 dias

Figura 12 Reprodutibilidade intraexaminador - morfométrico

Figura 13 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na reabsorção óssea periodontal – 07 dias

Figura 14 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na reabsorção óssea periodontal – 15 dias

Figura 15 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na reabsorção óssea periodontal – 30 dias

Prancha 8 Radiografias das mandíbulas a partir das quais foi realizada a avaliação do suporte ósseo periodontal – 07 dias

Prancha 9 Radiografias das mandíbulas a partir das quais foi realizada a avaliação do suporte ósseo periodontal – 15 dias

Prancha 10 Radiografias das mandíbulas a partir das quais foi realizada a avaliação do percentual suporte ósseo – 30 dias

Figura 16 Reprodutibilidade intraexaminador - PSO

Figura 17 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* no percentual de suporte ósseo – 07 dias

Figura 18 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* no percentual de suporte ósseo – 15 dias

Figura 19 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* no percentual de suporte ósseo – 30 dias

Figura 20 Efeito do LPS em diferentes concentrações, 0,01, 0,1 e 1 µg/mL na liberação de nitrito, substrato do NO, em fibroblastos gengivais

Figura 21 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na liberação de NO em fibroblastos gengivais

Figura 22 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na viabilidade celular de fibroblastos gengivais

Figura 23 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na cicatrização de lesão palatina de acordo com o tempo – 15 dias
Prancha 11 Aspecto clínico do palato – 07 dias
Prancha 12 Aspecto clínico do palato – 15 dias
Figura 24 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na mieloperoxidase – cicatrização 07 dias
Figura 25 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na mieloperoxidase – cicatrização 15 dias
Figura 26 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na NAG em tecido onde foi realizada a lesão palatina – cicatrização 07 dias
Figura 27 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* na NAG em tecido onde foi realizada a lesão palatina – cicatrização 15 dias

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

CD44 – Receptor presente na superfície do linfócito

C5a – Complemento

cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva

COX – Enzima ciclooxigenase

COX-1 - Enzima ciclooxigenase-1

COX-2 - Enzima ciclooxigenase-2

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ECAM-1 Molécula 1 de adesão do leucócito ao endotélio

Fc – Receptores para moléculas de anticorpos nos PMNs

FMLP – Proteína fMet-Leu-Phe

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

ICAM-1 - Molécula 1 de adesão intercelular

Ig – Imunoglobulina

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

IL-8 – Interleucina 8

IL-1β – Interleucina 1β

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IFNy – Interferon

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA - Lipoteico

MMP - metaloproteinase

NADPH – Nicotidamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

NO^{3-} - Nitrato

NO^{2-} - Nitrito

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

OH – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

$ONOO^{-}$ Peróxidonitrito

O_2^{-} Radical superóxido

PAF – Fator de agregação plaquetária

PG – Prostaglandina

PGE_2 – Prostaglandina E_2

PMNs – Leucócitos Polimorfonucleares

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TX – Tromboxano

TA_2 – Tromboxano A_2

TNF-α- – Fator de Necrose Tumoral α

TNF-β- – Fator de Necrose Tumoral β

TPA – 12 – *O*- tetradecanoilforbol acetato

UV – Ultra-violeta

INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

Inflamação é uma complexa mobilização dos sistemas de defesas celular e humoral do organismo, com participação vascular, neural e hormonal, desencadeada por qualquer estímulo físico, químico ou biológico. Quando não reprimida pode causar severa descompensação fisiológica, disfunção orgânica e até a morte. É dividida em duas categorias, aguda e crônica, baseando-se no tempo do decurso inflamatório e aspectos fisiológicos. Alguns sinais clássicos da inflamação são vasodilatação e edema, com presença de área eritematosa, calor no local do dano tecidual, dor e possível perda de função do local afetado (SHERWOOD *et al*., 2004; KANTARCI *et al.,* 2005).

As respostas de defesa do hospedeiro são controladas ou moduladas por uma variedade de mediadores químicos. Os sistemas imune inato e adaptativo possuem um papel crítico no desencadear da inflamação. Esses sistemas oferecem reações protetoras, mas se forem desenvolvidos inapropriadamente tornam-se prejudiciais. O resultado final de uma inflamação pode ser a resolução, com ou sem cicatrização ou a evolução para o estado crônico. se o estímulo ou o patógeno persistirem (RANG *et al*., 2007).

A boca, parte integrante do sistema estomatognático, também está sujeita a apresentar situações que a levem a desenvolver processos inflamatórios. A inflamação e destruição dos tecidos periodontais, por exemplo, estão amplamente ligadas ao resultado da resposta de um hospedeiro susceptível ao biofilme microbiano contendo patógenos bacterianos (SCHENKEIN, 2006).

Além dos diversos agentes como antibióticos, antiinflamatórios não esteroidais, anti-sépticos, íons metálicos e agentes oxigenantes, utilizados no tratamento da doença periodontal, estudos têm sido realizados para se verificar a ação de determinados produtos naturais (MANSON *et al.*, 1999). Os fitoterápicos destinados para uso na odontologia possuem ações anti-sépticas, antiinflamatórias, adstringentes e cicatrizantes; ações essas que podem ser encontradas em plantas consideradas medicinais como sanguinária (*Sanguinaria canadensis*), calêndula (*Calendula officinalis*), mirra (*Comiphora molmol*), sálvia (*Salvia officinalis*), própolis,

hamamelis (*Hamamelis virginiana*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e echinacea (*Echinacea purpurea*) (RACINE, 1988).

A partir desses estudos com produtos naturais e, visando encontrar novos tratamentos para alterações bucais, escolhemos para estudar uma planta que é muito recomendada em consultórios odontológicos, a *Malva sylvestris* L. Sendo nosso trabalho direcionado para tentar verificar se, a planta em questão, possui ação antiinflamatória em doença periodontal e também ação cicatrizante.

1.2. Mediadores Inflamatórios

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto outras como plaquetas e leucócitos têm acesso à área a partir do sangue (RANG *et al.,* 2007).

A) Leucócitos: células móveis, divididas em polimorfonucleares e mononucleares.

- *Polimorfonucleares:* primeiros leucócitos sangüíneos a alcançarem a área da reação inflamatória. Migram do vaso para o local afetado através de uma interação entre as moléculas de adesão situadas internamente na célula endotelial (SHERWOOD *et al*., 2004). São subdivididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, todos granulócitos. Os neutrófilos englobam, matam e digerem microrganismos. Se os neutrófilos forem indevidamente ativados, os produtos tóxicos de oxigênio e as enzimas proteolíticas podem danificar os próprios tecidos do hospedeiro (RANG *et al*., 2007; SHERWOOD *et al.,* 2004).

- *Mononucleares:* os monócitos chegam à área afetada várias horas após os neutrófilos polimorfonucleares. Nos tecidos, os monócitos são transformados em macrófagos. Nas áreas teciduais os macrófagos ingerem restos teciduais e células mortas, bem como microrganismos, e são capazes de destruir muitos desses microrganismos, mas não todos (RANG *et al*., 2007). Os linfócitos também fazem parte desse grupo.

B) Mastócitos: a membrana dos mastócitos possui receptores para uma classe especial de anticorpos, a imunoglobulina E (IgE). Eles liberam histamina, heparina, leucotrienos, fator de crescimento neural, algumas interleucinas, entre outros mediadores (SCHENKEIN, 2006).

C) Células endoteliais vasculares: secretando óxido nítrico (NO) que provoca o relaxamento do músculo liso subjacente, desempenham papel na vasodilatação e na distribuição de plasma e de células sangüíneas para a área de inflamação (RANG *et al.*, 2007; SHERWOOD *et al.*, 2004).

D) Plaquetas: podem desempenhar papel ativo na inflamação. Possuem receptores de baixa afinidade para IgE. Além de produzir tromboxano A_2 e fator de agregação plaquetária (PAF), podem produzir radicais livres e proteínas catiônicas pró-inflamatórias (RANG *et al.*, 2007).

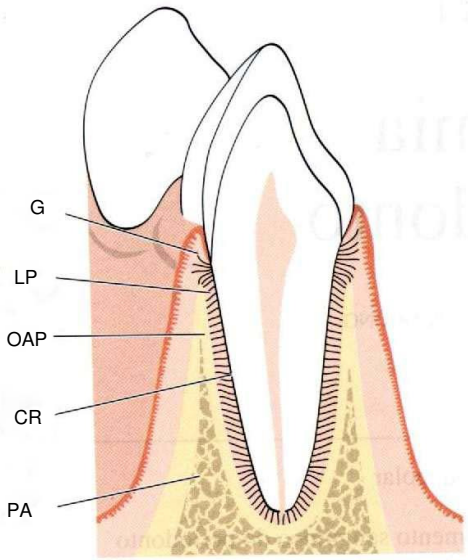
E) Neurônios: Alguns neurônios sensoriais, além de transmitirem impulsos para o sistema nervoso central (SNC), liberam neuropeptídeos inflamatórios quando estimulados (SHERWOOD *et al.*, 2004).

1.3. Periodonto

O periodonto é considerado como um sistema orgânico composto por gengiva, ligamento periodontal, osso e cemento (BARTOLD *et al.*, 2006). O osso alveolar, que é formado pelo osso alveolar propriamente dito, é contínuo ao processo alveolar, formando a lâmina óssea que está localizada lateralmente ao ligamento periodontal (Fig. 1).

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal. O periodonto forma também uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, essa unidade está sujeita a alterações morfológicas, assim como, alterações relacionadas com modificações no meio bucal. Cada componente tem uma estrutura especializada e estas estruturas definem sua função (NANCI *et al.*, 2006).

O desenvolvimento dos tecidos periodontais ocorre durante o crescimento e a formação dos dentes (CARRANZA *et al.*, 1999; LINDHE, 1999).



Adaptado de Lindhe, 1999

Fig. 1: Desenho esquemático do dente com seu periodonto: a gengiva (G), o ligamento periodontal (LP), o cemento radicular (CR) e osso alveolar (o osso alveolar propriamente dito (OAP) e o processo alveolar (PA)).

1.4. Componentes do Periodonto

1.4.1. Gengiva

A mucosa bucal é contínua com a pele dos lábios e com a mucosa do palato mole e faringe. A mucosa bucal compreende:

- Mucosa mastigatória: gengiva e o revestimento do palato duro;
- Mucosa especializada: que recobre o dorso da língua;
- Mucosa de revestimento: parte restante (SQUIER *et al.*, 2001).

A gengiva é parte da mucosa mastigatória que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. A gengiva assume sua forma e textura definitiva em associação com a erupção dos dentes. Em direção à coroa, a gengiva de cor rósea, termina na margem gengival livre, que possui um contorno arredondado. Em sentido apical, a gengiva é contínua com a mucosa alveolar (mucosa de revestimento), que é frouxa e de cor vermelha mais escura, da qual

geralmente é separada por uma linha limitante chamada de junção mucogengival (LASCALA *et al.,* 1999; LINDHE, 1999). A gengiva é composta principalmente por colágeno, (tipo I, III, IV e VI), proteoglicanas, fibronectinas, osteonectinas, tenascinas e elastina (CHAVRIER *et al*., 1984; BARTOLD *et al*., 2006).

As duas partes da gengiva podem ser diferenciadas em:

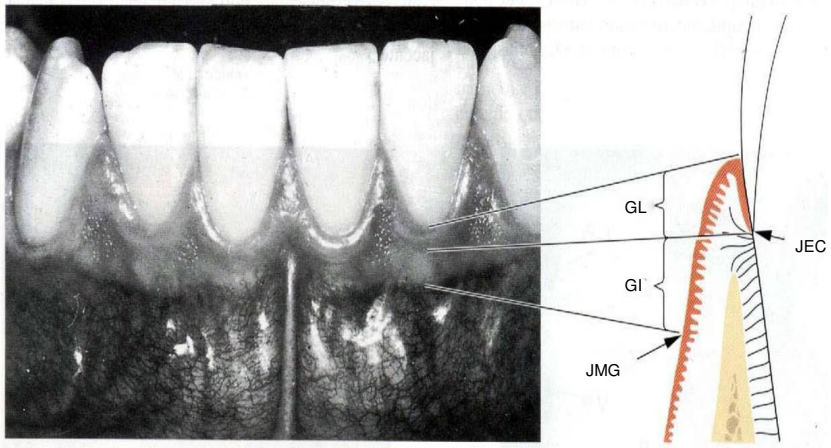
***A) Gengiva Livre* (Fig. 2):**

A gengiva livre tem cor rósea, superfície opaca e consistência firme, compreendendo o tecido gengival das partes vestibular, lingual ou palatina dos dentes, além da gengiva interdental ou papilas interdentais. Pelos lados vestibular e lingual dos dentes, a gengiva livre se estende a partir da margem gengival livre em direção apical até a ranhura gengival livre, que se acha posicionada em um nível correspondente à junção esmalte-cemento. A margem gengival livre forma uma pequena invaginação ou sulco entre o dente e a gengiva. Quando uma sonda periodontal é inserida nesta invaginação e forçada apicalmente na direção da junção esmalte-cemento, o tecido gengival é separado do dente e uma "bolsa gengival" ou "sulco gengival", é aberto artificialmente. Na gengiva normal ou clinicamente sadia não há, em verdade, "bolsa gengival" ou "sulco gengival" presente, pois a gengiva está em íntimo contato com o dente. Após a erupção dentária ter sido completada, a margem gengival livre fica localizada na superfície do esmalte cerca de 0,5-2 mm coronariamente à junção cemento-esmalte (LINDHE, 1999; MULLER *et al*., 2002).

***B) Gengiva Inserida* (Fig. 2):**

A gengiva inserida é, na direção da coroa, limitada pela ranhura gengival livre ou, quando a ranhura está ausente, por um plano horizontal que passa pelo nível da junção esmalte-cemento. A gengiva inserida estende-se em direção apical até a junção mucogengival, onde se torna contínua com a mucosa alveolar. A gengiva inserida tem textura firme é queratinizada, possui cor rósea e, com freqüência, mostra uma superfície que apresenta uns pontilhados delicados, os quais lhe conferem um aspecto semelhante ao da casca de laranja. Esse tipo de mucosa está firmemente inserido no osso alveolar e cemento radicular subjacentes, por meio de

fibras do tecido conjuntivo gengival, portanto, é comparativamente imóvel em relação à mucosa alveolar. A mucosa alveolar, não é queratinizada, tem a cor vermelha escura, está localizada apicalmente à junção mucogengival e, por outro lado, tem uma ligação frouxa com o osso (MANSON *et al.*, 1999, MULLER *et al.*, 2002).



Adaptado de Lindhe, 1999

Fig. 2: Desenho esquemático das gengiva marginal livre (GL), da gengiva inserida (GI), da junção muco gengival (JMG) e junção esmalte-cemento (JEC).

1.4.2. Epitélio Bucal

O epitélio que cobre a gengiva livre e que fica voltado para a cavidade bucal pode ser definido como epitélio bucal. O epitélio que fica voltado para o dente, sem estar aderido à superfície dental, é chamado de epitélio do sulco. O epitélio juncional é o epitélio que promove a união da gengiva com o dente.

O limite entre o epitélio bucal e o tecido conjuntivo subjacente segue um curso ondulado. As partes do tecido conjuntivo que se projetam no epitélio são chamadas de papilas do tecido conjuntivo e são separadas entre si pelas cristas epiteliais. A presença de cristas epiteliais é um aspecto morfológico característico do epitélio bucal e do epitélio do sulco. Na gengiva normal, não inflamada, as cristas epiteliais e as papilas do tecido conjuntivo estão ausentes no limite entre o epitélio juncional e o tecido conjuntivo subjacente. (SQUIER *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2002).

O epitélio bucal é um epitélio pavimentoso, estratificado, queratinizado que, tomando-se por base o grau de diferenciação das células produtoras de queratina, pode ser dividido nas seguintes camadas celulares:

- camada basal
- camada espinhosa
- camada granulosa
- camada queratinizada

Além das células produtoras de queratina que compreendem cerca de 90% da população celular total, observa-se que o epitélio bucal contém também melanócitos, células de Langerhans e células inespecíficas (as quais não apresentam as mesmas características ultra-estruturais dos outros dois tipos de células). Todos os três tipos de células são estrelados e têm prolongamentos citoplasmáticos de tamanho e aspecto variados. Os melanócitos são células que contêm pigmento, enquanto as células de Langerhans desempenham um papel no mecanismo de defesa da mucosa bucal como apresentadoras de antígenos e servem também como conexão entre o epitélio e o sistema imune adquirido (BANCHEREAU *et al.*, 1998; SQUIER *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2002, PÖLLÄNEN *et al.*, 2003).

1.4.3. Epitélio Juncional

Os componentes teciduais da região dentogengival atingem suas características estruturais definitivas em associação com a erupção dos dentes. Quando o esmalte dentário alcança seu desenvolvimento completo, as células produtoras do esmalte (ameloblastos) sofrem uma redução em sua altura, produzem uma lâmina basal e formam, juntamente com as demais células do epitélio externo do órgão do esmalte, o chamado epitélio reduzido do órgão do esmalte. A lâmina basal (lâmina epitelial de inserção) fica em contato direto com o esmalte; o contato entre esta lâmina e as células epiteliais é mantido por hemidesmossomos. O epitélio reduzido do órgão do esmalte envolve a coroa do dente do momento em que o esmalte se torna mineralizado adequadamente até que comece a erupção dentária.

Durante as fases terminais da erupção dentária, todas as células do epitélio reduzido do órgão do esmalte são transformadas no epitélio juncional. Este epitélio transformado é contínuo com o epitélio bucal e participa da inserção da gengiva ao

dente (SCHROEDER *et al.,* 1988; BARTOLD *et al*., 2006). Em dentes saudáveis o epitélio juncional termina na junção esmalte-cemento (BARTOLD *et al*., 2006).

O epitélio juncional é um epitélio escamoso estratificado, não diferenciado, apresentando constante renovação em suas células, o que contribui para o equilíbrio entre hospedeiro e parasita e rápido reparo no tecido afetado. Esse epitélio é formado por células achatadas derivadas da camada cilíndrica basal, orientadas de forma paralela à superfície dos dentes. A camada de células ligadas à superfície do dente propicia o complexo estrutural que liga a gengiva ao dente, a inserção epitelial. A ligação do epitélio juncional ao dente é mediada através de mecanismos ultramicroscópicos, consistindo em hemidesmossomas da membrana plasmática das células diretamente ligados à superfície do dente (NANCI *et al*., 2006).

As células do epitélio juncional se diferem das células do epitélio gengival. Elas contêm mais citoplasma, retículo endoplasmático rugoso e mais complexos de Golgi. Elas exibem poucos tonofilamentos e desmossomos com espaços intracelulares extensos (PÖLLÄNEN *et al*., 2003).

1.4.4. Fluido Gengival

O fluido gengival é um exsudato de composição variada encontrado no sulco ou bolsa periodontal, entre o dente e a gengiva marginal. O fluido gengival contém componentes do soro, células inflamatórias, tecido conjuntivo, epitélio e bactérias que habitam a margem gengival do sulco ou bolsa. Em sulcos saudáveis a quantidade de fluido gengival é pequena e seus constituintes participam da manutenção normal da função do epitélio juncional.(EMBERY *et al*., 1994)

Na ocorrência de inflamação a quantidade de fluido aumenta e sua composição se assemelha a um exsudato inflamatório. O aumento do fluido gengival contribui para a defesa do hospedeiro pela remoção de colônias de bactérias e seus metabólitos para fora do sulco, restringindo sua penetração no tecido (PÖLLÄNEN *et al*., 2003).

O fluído gengival do sulco também contêm leucócitos polimorfonucleares, que passam para o sulco, vindos do tecido conjuntivo subepitelial, passando através do epitélio juncional. As células polimorfonucleares, junto com peptídeos antimicrobianos secretados, originariamente, do epitélio juncional, sangue e fluido do

tecido, representam a primeira linha de defesa no controle da microbiota local (DALE, 2002). Entre as moléculas presentes estão interleucina (IL)-8, IL-1α e IL-1β, fator de necrose tumoral e linfócitos (NANCI *et al.*, 2006). Estes peptídeos são parte do sistema imune inato, um conjunto complexo de respostas que mantêm as bactérias invasoras sob sua ação, mantendo também a microbiologia local normal e a saúde gengival local (WEINBERG *et al.*, 1998).

1.5. Ligamento Periodontal

O desenvolvimento do ligamento periodontal começa com a formação da raiz, antes da erupção dental (CHO *et al.*, 2000). O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, com muitas células e ricamente vascularizado; que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito (CARRANZA *et al.*, 1999; LINDHE, 1999, MANSON *et al.*, 1999).

Os fibroblastos são as células presentes em maior quantidade no ligamento periodontal, sendo responsáveis pelo metabolismo dos componentes da matriz extracelular. A população de fibroblastos no ligamento periodontal é heterogênea. (CHO *et al.,* 1992; LIU *et al.*, 1997). Eles podem ter a capacidade de aumentar células ósseas e cementoblastos. Podem também ser responsáveis pela produção de fibras extrínsecas no cemento acelular no ligamento periodontal maduro (GROENEVELD *et al.*, 1995). Fibroblastos dessa região periodontal são necessários para manter a espessura normal do ligamento, prevenindo a invasão de osso e cemento (MELCHER, 1970).

1.6. Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo é o componente predominante da gengiva e do ligamento periodontal. Os principais constituintes do tecido conjuntivo são as fibras colágenas (60% do volume do tecido), fibroblastos (5%), vasos, nervos e matriz (35%) (BARTOLD *et al.*, 2006).

O tecido conjuntivo epitelial adjacente ao epitélo juncional contém um plexo vascular extenso. Células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T extravasam continuamente desta densa rede capilar e vênulas pós-

capilares migrando através do epitélio juncional para o sulco e fluído gengival (NANCI *et al.*, 2006).

1.6.1. Células do Tecido Conjuntivo

a) Fibroblastos: célula predominante do tecido conjuntivo (cerca de 65% da população total). Está relacionado com a produção dos vários tipos de fibras encontrados no tecido conjuntivo e participa também na síntese e degradação da matriz no tecido conjuntivo. É uma célula fusiforme ou estrelada, com núcleo oval. (LINDHE, 1999). Quando tratados com lipopolissacarídeos (LPS), componentes externos da parede de bactérias Gram negativas, produzem citocinas, IL-1, IL-6, IL1-β e fator de necrose tumoral (TNF), eles também sintetizam a forma induzida da enzima NO sintase e podem liberar prostaglandinas (SUSILOWATI *et al.,* 2002; VENEGAS *et al.*, 2004).

b) Mastócito: responsável pela produção de determinados componentes da matriz, como substâncias vasoativas que podem afetar a função do sistema microvascular e controlar o fluxo do sangue através do tecido. No citoplasma encontra-se grande número de vesículas contendo substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas proteolíticas, histamina e heparina.

c) Macrófago: desempenha várias funções de fagocitose e síntese no tecido. São particularmente numerosos no tecido inflamado.

d) Leucócitos polimorfonucleares: possuem núcleo lobulado e numerosos lisossomos com enzimas no citoplasma.

e) Linfócitos: possuem núcleo com forma oval ou esférica;

f) Plasmócitos: possuem núcleo esférico de localização excêntrica (CARRANZA *et al.*, 1999; MANSON *et al.*, 1999; BARTOLD *et al.*, 2006).

1.7. Matriz

Produzida inicialmente no tecido conjuntivo pelos fibroblastos, embora alguns componentes sejam elaborados por mastócitos e outros ainda derivados do sangue. A matriz é o meio no qual as células do tecido conjuntivo acham-se embutidas e é essencial para a manutenção da função normal do tecido conjuntivo. O transporte de

água, eletrólitos, nutrientes e metabólitos em direção às células do tecido conjuntivo, e o seu retorno acontecem dentro da matriz. Os principais componentes da matriz do tecido conjuntivo são macromoléculas protéico-polissacarídeas, como as proteoglicanas e glicoproteínas (NAGASE, 1997; PÖLLÄNEN *et al.*, 2003).

1.8. Cemento Radicular

O cemento radicular é um tecido calcificado especializado que recobre as superfícies radiculares dos dentes e, ocasionalmente, pequenas porções das coroas dos dentes. Possui muitas características em comum com o tecido ósseo, mas não contém vasos sangüíneos e linfáticos, não tem inervação, não sofre remodelação e reabsorção fisiológicas, porém se caracteriza pela deposição contínua ao longo da vida. Como outros tecidos mineralizados, este é constituído de fibras colágenas embutidas em uma matriz orgânica. Sua porção mineral é formada principalmente por cristais de hidroxiapatita. O cemento desempenha diferentes funções: insere as fibras do ligamento periodontal à raiz e contribui para o processo de reparo após danos causados à superfície radicular. São conhecidos dois tipos de cemento:

A) Cemento primário ou cemento acelular, que é formado em associação com a formação da raiz e erupção dos dentes.

B) Cemento secundário ou cemento celular, que se forma após a erupção do dente e, também, em resposta a demandas funcionais. Áreas da superfície radicular podem ser alternadas com cemento celular e acelular (SCHROEDER, 1992; CHO *et al.,* 2000).

1.9. Osso Alveolar

O processo alveolar é definido como as partes da maxila e mandíbula que formam e dão suporte aos alvéolos dos dentes. O processo alveolar se desenvolve em associação com o desenvolvimento e erupção dos dentes e é gradativamente reabsorvido quando os dentes são perdidos. Em conjunto com o cemento radicular e a membrana periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir e absorver as forças geradas pela mastigação e outros contatos dentários.

O osso alveolar renova-se constantemente em resposta às demandas funcionais. Durante o processo de remodelação, as trabéculas ósseas são continuamente reabsorvidas e reformadas, a massa do osso cortical é dissolvida e substituída por novo osso. Durante a decomposição do osso cortical, são formados canais de reabsorção, por meio de vasos sangüíneos em proliferação. Estes canais, que contêm um vaso sangüíneo no centro, são posteriormente preenchidos por novo osso. A reabsorção do osso está associada com osteoclastos (BARTOLD, 1990; CHEN *et al.*, 1993; NANCI *et al.* 2006).

1.10. Suprimento Sangüíneo

A vascularização da região periodontal é muito afetada durante o progresso de doenças periodontais (YUMOTO *et al.*, 2007). Várias artérias suprem certas regiões bem definidas da dentição. Há inúmeras anastomoses presentes entre as diferentes artérias. Todo o sistema de vasos sangüíneos, em vez de grupos individualizados de vasos, deve ser encarado como uma unidade que faz o suprimento dos tecidos duros e moles da maxila e mandíbula. Algumas artérias que fazem o suprimento sangüíneo são: artéria dentária, que é um ramo da artéria alveolar superior ou inferior, artéria sublingual, artéria mentoniana, artéria facial e artéria intra-septal (CARRANZA *et al.*, 1999; LINDHE, 1999).

1.11. Sistema Linfático do Periodonto

Os vasos linfáticos menores, os capilares linfáticos, formam uma rede extensa no tecido conjuntivo. A linfa é absorvida do fluido tecidual através das paredes delgadas dos capilares. Dos capilares, a linfa passa aos vasos linfáticos maiores, que com freqüência ficam nas vizinhanças dos vasos sangüíneos correspondentes. Antes de a linfa penetrar na circulação sangüínea, passa através de um ou mais nódulos linfáticos, nos quais é filtrada e suprida de linfócitos (LINDHE, 1999; MANSON *et al.,* 1999).

1.12. Inervação do Periodonto

Como os demais tecidos do corpo, o periodonto contém receptores que registram dor, tato e pressão (mecanoreceptores). Ao contrário da gengiva, do cemento e osso alveolar, o ligamento periodontal contém também proprioceptores que fornecem informação relativa a movimentos e posições. Além dos diferentes tipos de receptores sensoriais que pertencem ao sistema nervoso somático, existem componentes nervosos que inervam os vasos sangüíneos do periodonto. Estes componentes pertencem ao sistema nervoso autônomo. A inervação chega ao periodonto através do nervo trigêmeo (CARRANZA *et al.*, 1999; LINDHE, 1999; MANSON *et al.*, 1999).

1.13. Doenças Periodontais

A interação entre bactéria e células eucarióticas é complexa, processos ativos precisam existir para que se permita uma interação harmoniosa entre bactérias que normalmente habitam nosso organismo e o próprio organismo. Doenças periodontais são uma série de infecções no tecido periodontal, as quais podem levar eventualmente à perda dental. São tipos de inflamações resultantes da interação de um complexo biofilme localizado nas faces dentais com bactérias periodontopatogênicas e seus produtos, ativando uma resposta inflamatória. No entanto, o nível de destruição periodontal tem sido associado com certo grau de predisposição do hospedeiro (FENG *et al.,* 2006).

1.13.1. Biofilme Dental

A aderência de bactérias à estrutura dental é o primeiro passo no desenvolvimento da doença periodontal (MEYER *et al.*, 1993). Quando a higiene supragengival não é mantida, o biofilme se desenvolve por interações dinâmicas, com o resultado final sendo o estabelecimento de uma microbiota estruturada. Microrganismos da placa supragengival recebem nutrição da saliva e componentes da alimentação, aproximadamente todos os membros da microbiota supragengival produzem ácidos orgânicos fermentados de carboidratos. Os ácidos fermentados se

dispersam dentro do biofilme em um curto período de tempo. Se bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são alojadas no biofilme, ácidos orgânicos são armazenados dentro da barreira produzida por essas bactérias, resultando numa prolongada diminuição de pH ao redor da superfície do esmalte. No caso do biofilme subgengival há liberação de produtos pró-inflamatórios como lipopolissacarídeos e peptideoglicanos. Além do mais, se bactérias periodontopatogênicas estão presentes na área subgengival, o fluido gengival apresenta componentes que podem servir como nutrientes para as bactérias assacarolíticas ou fermentativas fracas. Bactérias periodontopatogênicas aumentam em número e produzem vários tipos de exotoxinas e enzimas que vão resultar em perda de inserção (NISHIHARA *et al*., 2004).

O biofilme bacteriano é definido como uma comunidade estruturada por bactérias circundadas por uma matriz produzida por elas (COSTERTON *et al*., 1999).

Embora haja uma microbiota residente, por exemplo, na pele humana, nasofaringe, trato urogenital e boca, esses microrganismos estão fisicamente controlados pela descamação do epitélio e respostas inatas e adquiridas do sistema imune. É difícil para o biofilme se desenvolver em indivíduos saudáveis devido a interação hospedeiro-parasita; no entanto, um complexo e massivo biofilme pode desenvolver-se nas faces dentais da cavidade bucal (NISHIHARA *et al.,* 2004). A comunidade do biofilme é uma unidade altamente controlada biologicamente com uma hierarquia ecológica. As populações residentes no biofilme têm duas estratégias de sobrevivência: a primeira é ter uma reprodução continuada para garantir a sobrevivência e a segunda, é a adaptação fisiológica ao meio ambiente disponível. A forma do biofilme é dependente da abundância do meio. Quando as condições não são favoráveis as populações residentes rapidamente diminuem (CALDWELL *et al*., 1999).

1.13.2. Reações ao Biofilme Dental

As reações inflamatórias e imunológicas ao biofilme dental e à microbiota patogênica representam características da gengivite e da periodontite (PIHLSTROM, 2005). Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para

proteger contra o ataque microbiano e impedir os microrganismos de se disseminarem. Em alguns casos, essas reações de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais, pois são capazes de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo. As reações inflamatórias e imunológicas também podem envolver níveis profundos do tecido conjuntivo e envolver o osso alveolar nesse processo destrutivo. Paradoxalmente os processos defensivos podem responder pela maior parte da lesão tecidual observada na gengivite e periodontite (LASCALA *et al.*, 1999; KANTARCI *et al.*, 2005).

Há diferenças significantes entre as reações inflamatórias e imunológicas que ocorrem no periodonto e em outras partes do corpo. Em parte, isso ocorre devido à própria anatomia do periodonto, ou seja, a permeabilidade característica do epitélio juncional resulta em um processo dinâmico envolvendo células e fluido gengival, preservando todo o tempo a integridade epitelial através da interface tecido duro e tecido mole (LUKE, 1992). Além disso, os processos inflamatórios e imunológicos nos tecidos periodontais não representam respostas a uma espécie microbiana simplesmente, mas a um grande número de microrganismos e seus produtos, agindo durante um período relativamente longo. As bolsas periodontais podem conter mais de 400 espécies diferentes de microrganismos, cada uma apresentando potenciais diferentes para indução de doença, os quais vão variar de acordo com o meio e o estágio de colonização. As diferentes espécies de bactérias interagem entre si e, embora algumas possam não ser patógenos suspeitos, ainda influenciam o processo da doença, participando através de fatores específicos de crescimento ou defesa que aumentam o potencial de virulência de outros microrganismos (PASTER *et al.*, 2001).

A destruição periodontal pode ser o resultado da combinação de fatores bacterianos que variam com o tempo. Essa situação contrasta com a de outras doenças, como tuberculose, sífilis, gonorréia, cujo hospedeiro enfrenta um único microrganismo, e o diagnóstico de uma fase ativa da doença está relacionado à presença ou ausência do patógeno (PAGE *et al.*, 1997; LINDHE, 1999).

As alterações periodontais podem ser causadas por toxinas produzidas por bactérias que induzem a inflamação, por uma reação imunológica que libera produtos, ou por lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa dos microrganismos Gram-negativos. O efeito de muitos produtos estruturais,

enzimáticos e residuais consiste em estimular a produção de mediadores químicos da inflamação, causando aumento da permeabilidade vascular e desencadeando, através de ações quimotáticas, o deslocamento das células inflamatórias para os tecidos, fazendo com que as células de defesa liberem agentes e citocinas pró-inflamatórias. As citocinas assim produzidas intensificam a resposta inflamatória, também aumentam a atividade de metaloproteinases de matriz, além de recrutar leucócitos para a área. O LPS é capaz de suscitar tanto uma resposta inflamatória quanto uma resposta imune, quando da sua interação com as células do hospedeiro. O LPS possui ações de estímulo à produção de citocinas, como também as moléculas da membrana externa, proteínas e enzimas, ligam-se as moléculas do LPS. O LPS também apresenta efeitos sobre o sistema de coagulação sangüínea e sobre o sistema de complemento, resultando na alteração da hemostasia e na formação de vários peptídeos pró-inflamatórios (OGURA *et al.*, 1994; FOKEMA *et al.*, 2002; MADIANOS *et al.*,2005).

As respostas imunes aos microrganismos são direcionadas, principalmente, contra as proteínas e os polissacarídeos da membrana externa e contra as enzimas e toxinas liberadas fora das células. Essas reações imunes provocam a liberação adicional de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, o que, por sua vez, causa o aumento da inflamação, com maiores danos ao hospedeiro (SCHENKEIN, 2006).

Um paciente que é suscetível e apresenta a doença periodontal não apresenta uma condição homogênea. A gravidade da lesão, mesmo no próprio indivíduo, varia freqüentemente de dente para dente e de uma superfície dentária para outra. Enquanto muitos dentes de um mesmo indivíduo podem exibir perda avançada de inserção, outros dentes ou superfícies dentárias, quase não são afetadas ou apresentam um periodonto normal. Cada sítio afetado representa um microambiente individualizado. Em algumas áreas, a lesão inflamatória pode ficar contida na gengiva (gengivite) por períodos de tempo prolongados, sem qualquer progressão aparente da doença para tecidos mais profundos, em outras áreas pode ocorrer destruição periodontal ativa (MARSHALL, 2004; FENG *et al.*, 2006; SCHENKEIN, 2006).

1.14. Mediadores do Processo Inflamatório Periodontal

1.14.1. Proteinases

A doença periodontal provoca a degradação tecidual e, portanto, as proteases, tanto do hospedeiro quanto dos microrganismos, são fundamentais para o processo destrutivo. As proteinases são aquelas moléculas que dividem as proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas. Estas enzimas proteolíticas podem ser classificadas em dois tipos principais: a) endopeptidases (proteinases) e b) exoproteinases; dependendo do local de atividade da enzima no seu substrato. As enzimas da primeira categoria segmentam as ligações no seu substrato dentro da cadeia de polipeptídeos, enquanto as exopeptidases dividem o seu substrato apenas em um ou dois resíduos a partir do final da cadeia de polipeptídeos (LINDHE*,* 1999; BARTOLD *et al.,* 2006). A liberação das proteases na gengiva e na área do sulco promove reações inflamatórias e contribui para causar dano ao tecido conjuntivo (LINDHE*,* 1999; BARTOLD *et al.*, 2006).

1.14.2. Metaloproteinases da matriz (MMP)

A degradação da matriz extracelular durante inflamação periodontal é um processo que envolve enzimas proteolíticas. Diferentes tipos de células do tecido periodontal produzem metaloproteinases da matriz. Em resposta as bactérias e citocinas inflamatórias, fibroblastos, células do epitélio juncional, osteoblastos/osteoclastos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares liberam proteinases, que estão envolvidas na defesa contra microrganismos. Ao mesmo tempo elas também contribuem para a degradação de componentes da matriz extracelular.

A presença elevada dessas enzimas MMP nas áreas doentes em relação às áreas sadias, o seu aumento durante a gengivite experimental e a redução após tratamento peridontal mostram o envolvimento das MMPs na destruição do tecido periodontal. (SUOMALAINEN *et al.*, 1989; BARTOLD *et al.*, 2006; KANTARCI *et al.*, 2006).

1.14.3. Leucócitos Polimorfonucleares (PMN)

O PMN é o leucócito predominante no sulco gengival, tanto na gengiva sadia quanto na que apresenta doença. Os PMNs são atraídos da circulação para esta área através de estímulos quimotáticos, suscitados pelo biofilme. Sob o aspecto histológico, os PMNs podem ser vistos atravessando o tecido conjuntivo gengival na inflamação. Entretanto, eles estão presentes também na gengiva clinicamente sadia e são recrutados em resposta aos fatores quimotáticos presentes na região sulcular. A quantidade de PMNs no sulco gengival aumenta com o desenvolvimento da gengivite. Mais PMNs são encontrados na periodontite, se compararmos com as áreas que exibem gengivite. Como ocorre em outros tecidos, a migração dos leucócitos dos vasos para o tecido conjuntivo gengival é controlado pelas moléculas de adesão.

Os PMNs presentes no sulco formam a primeira linha de defesa contra os patógenos periodontais. A elastase, uma serino-protease, é um dos componentes dos grânulos primários do PMN, o qual tem demonstrado causar destruição teciual, estando presente com o aumento da atividade nas áreas de inflamação gengival. A liberação de grânulos secundários pelos PMNs ocorre durante a migração da célula, sendo este processo independente da liberação dos grânulos primários, que acredita-se estar correlacionada com a ativação do PMN. Foram constatadas diferenças nas quantidades relativas de elastase (componentes dos grânulos primários) e lactoferrina (componente dos grânulos secundários) em áreas com categorias diferentes da doença. Uma proporção maior de lactoferrina em relação à elastase foi encontrada nas áreas com periodontite. Esta variação na liberação de enzimas dos grânulos primários pelos PMNs pode indicar alterações na função destes em diferentes ambientes da doença (LINDHE, 1999; KANTARCI *et al.*, 2006; SHENEKEIN, 2006).

1.14.4. Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis, secretadas por células, que agem como mensageiras transmitindo sinais para outras células. Elas realizam numerosas ações, as quais incluem a iniciação e manutenção das respostas imune e

inflamatória e a regulação do crescimento e diferenciação das células. As interleucinas são membros importantes do grupo das citocinas e encontram-se envolvidas, principalmente, na comunicação entre os leucócitos e outras células que participam dos processos imune e inflamatório, como as epiteliais, endoteliais e os fibroblastos. Estas moléculas são liberadas em pequenas quantidades e possuem ações variadas sobre as células que expressam o receptor específico para estas citocinas. As citocinas são numerosas, muitas realizam funções que se sobrepõem e são ligadas, formando uma rede ativa que controla a resposta do hospedeiro. Muitas citocinas são capazes de agir sobre a célula que as produziu, auto-estimulando sua própria produção e a produção de outras citocinas (LINDHE, 1999; SCHENKEIN, 2006).

1.14.5. Citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias

Essas citocinas participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como dos processos de reparo e resolução. As citocinas pró-inflamatórias primárias são o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina (IL)-1. As citocinas interleucinas (IL)-1β, IL-6, IL-12, após estímulos bacterianos, são produzidos e liberados por monócitos/macrófagos, fibroblastos e mastócitos presentes no tecido afetado. As citocinas podem estimular a reabsorção óssea e inibir a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. (SHERWOOD *et al*., 2004; DAYAN *et al*., 2004). Várias citocinas, que são fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento de fibroblastos, são cruciais para processos de reparo e estão implicados na inflamação crônica (RANG *et al.,* 2007).

As citocinas antiinflamatórias incluem TGF-β, IL-4, IL-10, IL-13. elas inibem a produção de quimocinas e podem inibir respostas mediadas por células Th1 (RANG *et al.,* 2007).

1.14.6. Quimocinas

São definidas como citocinas quimioatraentes, que controlam a migração de leucócitos durante reações inflamatórias e imunes. O principal exemplo é a interleucina 8 (IL-8), que possui funções quimiotáticas poderosas para os leucócitos,

particularmente os neutrófilos, mas também para os linfócitos e macrófagos. Estas moléculas agem para recrutar células de defesa para áreas onde elas são necessárias, e são importantes nas respostas mediadas por células (SEYMOUR *et al.,* 2001; RANG *et al.*, 2007; BARTOLD *et al.*, 2006).

1.14.7. Prostaglandinas

As bactérias são consideradas como agentes primários causadores da doença periodontal, mas a patogênese envolve outros fatores em conjunto. Mediadores como as prostaglandinas, que são derivadas do metabolismo do ácido araquidônico (AA), pela enzima ciclooxigenase (COX), principalmente as da série E (PGE_2), parecem ser críticos na progressão da doença (AZOUBEL *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias são capazes de estimular os macrófagos e outras células para produzirem quantidades abundantes de prostaglandinas, particularmente as PGE_2, que são potentes vasodilatadores e produtores de citocinas por várias células. A PGE_2 age sobre os fibroblastos e osteoclastos, juntamente com as citocinas, induzindo a produção de metaloproteinases da matriz, que é relevante para o processo de destruição periodontal (LINDHE, 1999, RANG *et al.*, 2007).

1.14.8. Óxido Nítrico (NO)

O NO provavelmente possui um efeito global pró-inflamatório: ele aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas, e é um potente vasodilatador. Algumas outras propriedades podem ser consideradas como antiinflamatórias; por exemplo, o NO endotelial inibe a adesão de neutrófilos e plaquetas, assim como agregação plaquetária. O NO ou compostos dele derivados também possuem ações citotóxicas, aumentando os mecanismos de defesa locais, entretanto, quando produzido em excesso, ele também pode prejudicar as células do hospedeiro (RANG *et al.*, 2007).

1.15. Características Clínicas e Histopatológicas da Doença Periodontal

A) Gengiva Normal

A gengiva normal é caracterizada clinicamente por sua coloração rósea, consistência firme e contorno parabólico da margem gengival. As papilas interdentais são firmes, não sangram à sondagem delicada e ocupam todo o espaço disponível abaixo das áreas de contato. A gengiva exibe, freqüentemente, uma aparência pontilhada e há uma margem em ponta de faca. A gengiva clinicamente sadia, não é tão perfeita, do ponto de vista histológico, quanto a gengiva normal. A gengiva normal é a de condição ideal, que só pode ser conseguida experimentalmente em humanos após controle de biofilme supervisionado meticulosamente durante várias semanas. A gengiva clinicamente sadia seria representada tipicamente pelo padrão de normalidade obtido por pacientes que mantêm um padrão satisfatório e regular de controle de placa (LINDHE, 1999; CARRANZA *et al.,* 1999).

Na gengiva normal se encontra, histologicamente, pouco ou nenhum infiltrado inflamatório. Possui alguns neutrófilos e macrófagos no epitélio juncional e, um infiltrado inflamatório discreto pode ser observado próximo ao plexo microvascular.

Histologicamente a gengiva clinicamente sadia exibe um infiltrado inflamatório. Há presença predominante de neutrófilos associados ao epitélio juncional e linfócitos no tecido conjuntivo subjacente. Mesmo neste estágio inicial da inflamação, que não é detectável clinicamente, observa-se a depleção do colágeno na área infiltrada, juntamente com um aumento das estruturas vasculares. A região do sulco gengival recebe exsudato e transudato, além de proteínas plasmáticas, que deixam os vasos, locomovendo-se através dos tecidos para criar o fluído gengival. Nesta fase, o infiltrado pode ocupar até 5% do volume do tecido conjuntivo, sendo composto por monócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Essas células são encontradas tanto no epitélio juncional quanto no tecido conjuntivo das gengivas clinicamente sadias. Os neutrófilos predominam na região sulcular e parecem migrar continuamente através do epitélio juncional para o sulco. O recrutamento de leucócitos, predominantemente PMNs, dos tecidos para a região do sulco gengival deve-se às ações quimiotáticas dos sistemas do hospedeiro (ex: interleucina 8,

componente do complemento C5a), e aos produtos microbianos (ex: lipopolissacarídeos). Com o depósito de placa e o desenvolvimento de gengivite clínica, há um aumento acentuado nos leucócitos recrutados para a área. Um efeito adicional da inflamação que estimula o rápido acúmulo de leucócitos é a regulação das moléculas de adesão sobre as células endoteliais, mediada por citocinas pró-inflamatórias. Isso estimula os leucócitos, particularmente os PMNs, nos estágios iniciais, a aderirem às vênulas pós-capilares e a começarem a se deslocar através do vaso pela quimotaxia, para o sulco gengival (MANSON *et al.*, 1999, PÖLLÄNEN *et al.,* 2003, RANG *et al.*, 2004).

A gengiva clinicamente sadia parece enfrentar a agressão microbiana sem progredir para uma condição de doença, devido a vários fatores defensivos, os quais incluem:

- efeito antimicrobiano dos anticorpos;
- a função fagocitária dos neutrófilos e macrófagos;
- o efeito destrutivo do complemento sobre os microrganismos;
- a descamação regular das células epiteliais para a cavidade bucal;
- a barreira epitelial intacta;
- o fluxo positivo do fluido do sulco gengival que pode remover os microrganismos e seus produtos nocivos.

Todos esses fatores podem agir simultaneamente para reduzir a carga bacteriana, prevenindo, assim, uma resposta excessiva dos sistemas de defesa do tecido, o que resultaria na formação de uma lesão.

A inflamação gengival é resultado de uma sobrecarga bacteriana que se deve, provavelmente, ao controle inadequado do biofilme. Alterações nos sistemas imunológico ou inflamatório podem provocar inflamação gengival patente. A periodontite crônica requer alguma predisposição adicional relacionada ao hospedeiro, como, por exemplo, insuficiência de neutrófilos, um forte ataque microbiano, ou uma incapacidade de produzir uma resposta imune efetiva aos microrganismos presentes na placa (DIXON *et al.*, 2004; KINANE *et al.,* 2007).

B) Inflamação Gengival

Após 10 a 20 dias de acúmulo de placa, sinais clínicos de gengivite se estabelecem na maioria das pessoas, embora haja grandes variações, com alguns indivíduos sendo mais resistentes e outros mais propensos à gengivite clínica. O termo gengivite se refere à inflamação limitada aos tecidos moles que circundam os dentes, não incluindo processos inflamatórios que se estendem à crista alveolar, ao ligamento periodontal, ou ao cemento (GENCO, 1996; KINANE *et al.* 2007).

A maioria dos casos ocorre por higiene bucal inadequada, o que leva ao acúmulo de biofilme. No entanto outros fatores podem afetar a susceptibilidade da gengiva à microbiota normal da boca, como por exemplo, fatores genéticos do hospedeiro (HUJOEL *et al.*, 2005).

Na maioria das faixas etárias, as mulheres demonstram menor freqüência de gengivite do que os homens, apresentado períodos de susceptibilidade aumentada. Tal fato está mais relacionado à melhor higiene das mulheres do que a alguma diferença fisiológica entre os gêneros. Além do período da puberdade, as mulheres apresentam maior susceptibilidade quando são expostas a altos níveis de progesterona, associados com a gestação ou com alguns modelos de contraceptivos orais. A progesterona parece aumentar a permeabilidade dos vasos sangüíneos gengivais, tornando esses tecidos mais sensíveis aos irritantes bacterianos, agentes físicos e químicos (NEVILLE, 2004).

Outros fatores que se mostram diretamente relacionados com a freqüência da gengivite são tabagismo, estresse, deficiências nutricionais, medicamentos, diabetes melito, intoxicação por metais, trauma, dentes com coroas protéticas com sobrecontorno e respiração bucal (SOUTHERLAND *et al.*, 2006; KINANE *et al.*, 2007).

A gengivite caracteriza-se por vermelhidão e tumefação gengival e uma tendência aumentada de sangramento dos tecidos moles à sondagem delicada. Ainda nessa fase os sinais clínicos são reversíveis, caso a placa microbiana seja removida e medidas eficazes de controle da placa sejam instituídas. A inflamação da gengiva pode ser localizada ou generalizada, a área envolvida pode ser difusa ou confinada à margem gengival livre (gengivite marginal) ou à papila interdental (gengivite papilar). Os sinais iniciais da gengivite incluem perda do pontilhado e

sangramento a uma leve sondagem. A gengiva saudável é rosa; com a inflamação a gengiva torna-se vermelho-clara. Com a progressão do quadro clínico, o tecido gengival torna-se mais vermelho e edematoso. As alterações clínicas podem parecer sutis nos estágios iniciais da gengivite, entretanto, as alterações histopatológicas subjacentes são bastante acentuadas (NEVILLE, 2004; NANCI *et al.*, 2006).

A gengivite incipiente demonstra um infiltrado inflamatório leve, composto de leucócitos polimorfonucleares que se acumulam no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio sulcular. Com a progressão, o infiltrado torna-se mais intenso e demonstra uma mistura de linfócitos, plasmócitos e células inflamatórias agudas. Área de fibrose, hiperemia, edema e hemorragia podem estar presentes (NEVILLE, 2004).

As fases clássicas da inflamação aguda e crônica não são facilmente aplicadas na doença periodontal, provavelmente porque em muitas situações de saúde clínica ocorre uma lesão similar a uma lesão aguda. Havendo superposição das alterações inflamatórias crônicas, de tal modo que os elementos agudos e crônicos coexistem nas lesões (LINDHE, 1999; VAN DER VELDEN, 2005).

A inflamação se desenvolve rapidamente à medida que o biofilme é depositado sobre o dente (PIHLSTROM *et al.*, 2005). Em 24 horas, alterações acentuadas são evidentes no plexo microvascular, sob o epitélio juncional, quando maior quantidade de sangue chega à área. A dilatação das arteríolas, capilares e vênulas do plexo dentogengival é evidente sob o aspecto histopatológico. Há um aumento da pressão hidrostática na microcirculação, com a formação de espaços intercelulares entre células adjacentes dos capilares endoteliais. Isso provoca um aumento na permeabilidade da rede microvascular, de modo que fluidos e proteínas escoem para os tecidos. As células epiteliais, ativadas pelas substâncias microbianas, produzem citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos da inflamação (KANTARCI *et al.*, 2005). Ocorre edema nos tecidos à medida que há acúmulo de fluido, inicia-se a infiltração celular e se desenvolve a gengivite clínica. Nos estágios iniciais, há predominância de PMNs devido à mobilidade e à flexibilidade dessas células, e aos efeitos das moléculas de adesão sobre os vasos sangüíneos, que aderem, preferencialmente, aos PMNs nos primeiros estágios da inflamação. Além disso, um gradiente quimotático se desenvolve a partir do sulco para o tecido conjuntivo, atraíndo assim, os PMNs na direção do sulco gengival. Os fatores quimotáticos incluem proteínas e peptídeos microbianos, como, por exemplo,

a extremamente potente fMet-Leu-Phe (FMLP) e fatores quimotáticos do hospedeiro, como as quimocinas (particularmente IL-8), moléculas produzidas por neutrófilos, como o leucotrieno B4 e moléculas derivadas da ativação do sistema do complemento (C5 a) (PAGE *et al.*, 1997; SCHENKEIN, 2006; RANG *et al.*, 2004, MADIANOS *et al.*, 2005).

PMNs sintetizam e liberam várias substâncias, como proteases que são associadas ao dano periodontal (LAH *et al.*, 1993). A interação entre PMNs com bactérias tem mostrado efeitos prejudiciais a vários tipos de células, incluindo fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (WEISS, 1989). Embora PMNs constitutivos, representem a primeira linha de defesa contra patógenos periodontais, sua interação com o biofilme dental pode levar à liberação de enzimas no tecido, também à síntese e secreção de moléculas pró-inflamatórias como metabólitos do AA. A presença de enzimas que causam dano ao tecido, lipídios na reabsorção óssea e outros mediadores inflamatórios contribuem para a perda de inserção observada na periodontite (KANTARCI *et al.*, 2003).

Os PMNs são atraídos para a área juntamente com outros leucócitos, tais como monócitos, macrófagos e linfócitos. Os macrófagos são, provavelmente, o único tipo de célula, além dos neutrófilos, que desempenham um papel de utilidade no sulco: eles fagocitam os PMNs mortos ou que estão morrendo, removendo-os da área. Isso é de grande utilidade para o hospedeiro, uma vez que os PMNs que estão morrendo ou superativados são capazes de realizar a degranulação, que é a liberação de suas enzimas de maneira descontrolada, causando excitação e danos maiores aos tecidos do hospedeiro com posterior exacerbação da inflamação (SCHENENKEIN, 2006).

À medida que a lesão e o fluxo do fluido do sulco gengival aumentam, ocorre a diluição de substâncias nocivas tanto para o tecido quanto para o sulco. As bactérias e seus produtos podem, então, ser difundidos para o sulco. As proteínas plasmáticas que escapam da microcirculação incluem proteínas defensoras como anticorpos, componentes do sistema do complemento e inibidores da protease, além de outras macromoléculas que possuem várias funções. O volume do exsudato gengival é proporcional à gravidade da inflamação gengival presente (LINDHE, 1999).

Concomitantemente com essas alterações vasculares, o deslocamento dos leucócitos do sistema vascular dentogengival é reforçado pelas moléculas de adesão, molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula-1 de adesão do leucócito ao endotélio (ECAM-1) e outras adesinas. Essas moléculas, ajudam o leucócito a aderir às vênulas pós-capilares e as células a deixarem o vaso sangüíneo. Assim, os PMNs chegam ao sulco em grandes quantidades, iniciando sua função de fagocitose da bactéria, auxiliados pelo complemento e anticorpos (NOGUSHI *et al.*, 2001; DIXON *et al.*, 2005).

Os linfócitos podem ficar retidos nos tecidos quando em contato com antígenos, citocinas ou moléculas de adesão, não sendo assim perdidos através do epitélio juncional em direção à placa e à cavidade bucal, como acontece com os neutrófilos. A maioria dos linfócitos possui a capacidade de produzir receptores CD44 nas suas superfícies, o que permite a adesão da célula à estrutura do tecido conjuntivo. Isso é compatível com a necessidade das células T e B de permanecerem nos tecidos e realizarem funções locais imunológicas celulares e humorais (GEMMEL & SEYMOUR, 2004; PERSSON, 2005).

A resposta celular fica bem estabelecida, provavelmente, por volta de dois a quatro dias do início do acúmulo da placa, sendo auxiliada por substâncias quimotáticas oriundas da microbiota da placa, bem como, por células e secreções do hospedeiro. Os leucócitos se movem através do tecido conjuntivo e a maior parte parece ficar acumulada na região do epitélio juncional e do sulco gengival. Os neutrófilos parecem entrar preferencialmente no sulco gengival, sendo freqüentemente denominados leucócitos de sulco (CARRANZA *et al.*, 1999; SCHENKEIN, 2006).

Sete dias após o acúmulo de placa, período de tempo aproximado, em virtude das acentuadas diferenças individuais encontradas nos seres humanos, sob o aspecto histológico, os vasos que se encontram abaixo do epitélio juncional permanecem dilatados, mas sua quantidade aumenta em função da abertura das redes capilares anteriormente inativas (CARRANZA *et al.*, 1999; SCHENKEIN, 2006).

Os linfócitos e neutrófilos são os leucócitos predominantes no infiltrado nesse período e uma quantidade muito pequena de plasmócitos é observada no interior da lesão. O infiltrado de células pode representar até 15% do volume do tecido

conjuntivo. No interior da lesão, ocorre a degeneração dos fibroblastos; isso ocorre provavelmente por apoptose e serve para remover essas células da área, permitindo então, maior infiltração dos leucócitos (CARRANZA *et al.*, 1999; SCHENKEIN, 2006).

Do mesmo modo, ocorre a destruição do colágeno na área infiltrada sendo isso necessário para que os tecidos sejam empurrados, acomodando o infiltrado celular. Neste período, alterações inflamatórias são detectáveis através do exame clínico e, por volta do final da segunda semana de acúmulo de placa, depósitos subgengivais podem ser observados. As células basais do epitélio juncional e sulcular proliferam, representando uma tentativa do organismo de reforçar a barreira inata contra a microbiota (CARRANZA *et al.*, 1999; SCHENKEIN, 2006).

A duração desse período em humanos ainda não foi determinada. Esta lesão pode persistir por muito mais tempo do que o esperado e a variabilidade do tempo necessário para a lesão aumentar depende da suscetibilidade do indivíduo.

Em geral, há intensificação do estado inflamatório à medida que a exposição da placa persiste. Há um aumento na exsudação do fluido e na migração dos leucócitos para os tecidos e sulco gengival. Clinicamente esta lesão exibirá edema maior do que o período anterior. Observa-se um grande número de plasmócitos maduros situados principalmente na porção coronária do tecido conjuntivo, bem como ao redor dos vasos. A perda de colágeno continua a ocorrer nas direções lateral e apical, à medida que o infiltrado celular sofre expansão, resultando em espaços destituídos de colágeno que se estendem mais profundamente nos tecidos, os quais se encontram, então, disponíveis para a infiltração dos leucócitos. Neste período, o epitélio dentogengival continua a proliferar e as cristas se prolongam no sentido do tecido conjuntivo, numa tentativa de manter a integridade epitelial e formar uma barreira contra a penetração microbiana. O epitélio da bolsa não está aderido à superfície dentária e encontra-se densamente infiltrado de leucócitos, predominantemente de neutrófilos que, eventualmente, migram através do epitélio para o sulco gengival ou para a bolsa. Em comparação com o epitélio juncional original, o epitélio da bolsa é mais permeável à passagem das substâncias para dentro e fora dos tecidos conjuntivos subjacentes, podendo sofrer ulcerações temporárias (PIHLSTROM *et al.,* 2005).

Neste período parecem existir dois tipos de lesões. No primeiro, a lesão permanece estável e não progride por meses ou anos; no segundo, a lesão se torna mais ativa e se transforma em lesão destrutiva progressiva (CARRANZA *et al.*, 1999; LINDHE, 1999; SCHENKEIN, 2006).

À medida que há um aprofundamento da bolsa, provavelmente devido à expansão do epitélio em direção apical como resposta à irritação provocada pela microbiota e por episódios de destruição microscópica de curta duração, a placa prossegue em seu crescimento no sentido apical, desenvolvendo-se nesse nicho ecológico de anaerobiose. O infiltrado inflamatório propaga-se lateralmente e, mais ainda, no sentido apical no tecido conjuntivo. A lesão avançada se apresenta com todas as características do período anterior, mas com diferenças importantes, representadas por perda do osso alveolar, dano extenso às fibras, migração apical do epitélio juncional a partir da junção cemento-esmalte, e manifestações disseminadas de danos inflamatórios e imunopatológicos aos tecidos (LINDHE, 1999).

Com a continuação da inflamação, o processo imunológico é iniciado ou reativado. As células de Langerhans no interior do epitélio apreendem o material antigênico proveniente dos microrganismos, levando-o para o tecido linfóide, onde ocorre a apresentação do antígeno para os linfócitos. Essa apresentação provoca o retorno dos linfócitos envolvidos para a área de exposição microbiana, onde as células B são transformadas em plasmócitos, produzindo anticorpos, ou as células T começam a auxiliar esta resposta humoral e a desenvolver respostas imunes mediadas pela célula contra esses microrganismos. Os indivíduos capazes de produzir uma resposta imune efetiva podem ser mais resistentes à periodontite do que aqueles cujas respostas imunes apresentam deficiência na quantidade ou qualidade.

O acúmulo de PMNs e a atividade no sulco provocam a liberação de muitas enzimas, o que produz efeitos nocivos para os tecidos do hospedeiro, assim como para os microrganismos. O infiltrado imunológico precisa de espaço no periodonto para iniciar sua função e, deve ocorrer a perda dos componentes estruturais para que se crie espaço físico para os leucócitos infiltrantes. Adicionalmente, à medida que as camadas epiteliais vão sendo destruídas, ocorre um novo crescimento epitelial em uma área mais apical, juntamente com a formação da bolsa. Há

formação de tecido de granulação, ricamente vascularizado e repleto de plasmócitos que produzem anticorpos. Este tecido ocupa mais espaço e muitas células, no seu interior, produzem enzimas e citocinas que degradam a matriz, e que causam também a destruição direta ou indireta do tecido conjuntivo e do osso. Finalmente, se não houver controle, os microrganismos continuarão a produzir material nocivo para o hospedeiro, este continuará com sua resposta frustrada contra esses produtos, ocorre aprofundamento da bolsa, expansão de tecido de granulação, perda óssea e do ligamento periodontal, além de perda eventual das estruturas de sustentação, causando esfoliação.

A presença de bactérias patogênicas é essencial para produzir periodontite, mas insuficiente. Outros fatores do hospedeiro, como tabagismo, diabetes e predisposição hereditária são determinantes importantes da presença e severidade da doença periodontal significativa. Embora uma periodontite leve e moderada esteja presente na maioria dos adultos, somente de 5% a 20% da população desenvolvem doença generalizada e severa (NEVILLE, 2004; KINANE *et al.*, 2007).

1.16. Processos de Defesa do Hospedeiro

Mecanismos de defesa inflamatórios e imunológicos encontram-se relacionados e, juntos, formam a resposta do hospedeiro ao ataque microbiano. As reações do hospedeiro ao parasita também podem ser divididas em inatas (não-específicas) e adaptativas (específicas). As reações inatas incluem a resposta inflamatória e não envolvem mecanismos imunológicos. Microrganismos virulentos podem ultrapassar esse sistema. As reações adaptativas tendem a ser mais efetivas, pois as células têm capacidade de reconhecer, memorizar e aumentar a eficácia da resposta, já que a resposta do hospedeiro é uma resposta imunológica direcionada para os patógenos que causam a agressão e seus subprodutos. Ela consiste em dois competentes sistemas desenvolvidos pelos linfócitos: o sistema imune mediado por células e sistema imune humoral (BOMAN, 2003; PERSSON, 2005).

Os mecanismos imunes inatos agem sem qualquer contato prévio com o microrganismo causador da doença. Estes mecanismos incluem as barreiras físicas da pele ou superfícies epiteliais da mucosa e os aspectos vascular e celular das

respostas inflamatórias. O hospedeiro possui extensas respostas de defesa para evitar a invasão dos microrganismos. Dependem muito da atividade de PMNs e mononucleares (macrófagos) (KANTARCI *et al.,* 2006). As respostas efetivas resultam em um reparo rápido da lesão ou ausência de lesão. Uma resposta ineficaz pode resultar numa lesão crônica, que não sofre reparo ou, se excessivamente distribuída, numa lesão na qual as respostas do hospedeiro são os aspectos mais significativos do processo destrutivo (LINDHE, 1999; RANG *et al*., 2004).

A dor é uma ocorrência rara na doença periodontal, particularmente nos estágios iniciais, todavia pode ocorrer em virtude do estímulo dos nervos aferentes pelos mediadores químicos da inflamação e da pressão devido ao grande aumento da tensão tissular. Uma manifestação periodontal de perda de função seria a função reduzida dos dentes que apresentam mobilidade após a periodontite. Os componentes dos processos imune e inflamatório interagem de forma dinâmica durante o desenvolvimento da doença periodontal (LINDHE, 1999; RANG *et al*., 2004).

Uma vez que o processo inflamatório é iniciado uma contínua cascata de eventos é desencadeada. Durante essa série de eventos, o organismo tenta eliminar os agentes invasores com a ativação de várias células com ações pró-inflamatórias (SERHAN *et al.,* 2004; VAN DYKE *et al*., 2003).

1.17. Cicatrização em Região de Palato

O palato serve ao mesmo tempo como teto da cavidade bucal e assoalho da cavidade nasal e possui duas porções: palato duro (objeto de nosso estudo), cujo esqueleto é o palato ósseo, e o palato mole, composto por tecido fibroso e músculos. A mucosa que reveste o palato duro é espessa e unida ao periósteo, formando o mucoperiósteo. Na excisão dessa camada o osso fica exposto porque ela não pode ser separada do periósteo. No terço anterior do palato duro estão presentes as rugas palatinas, as quais ajudam a prender o alimento contra a língua durante a mastigação (MADEIRA, 2003).

Quatro camadas são conhecidas no mucoperiósteo do palato. O epitélio estratificado, a lâmina própria, submucosa e o periósteo (CORNELISSEN *et al*., 1999).

Várias lesões bucais ocorrem na região do palato duro, provocadas por traumas físicos, químicos ou agentes biológicos. Após ocorrerem as lesões é necessário que ocorra o processo de cicatrização, e quanto mais rápido essa cicatrização ocorrer melhor.

A cicatrização é um processo altamente dinâmico e envolve interações complexas de moléculas de matriz extracelular, mediadores solúveis, várias células residentes e leucócitos infiltrados. O alvo imediato no reparo é alcançar a integridade e homeostase do tecido (SINGER et al., 1999). Para atingir o objetivo, o processo de cicatrização envolve três fases: inflamação, formação tecidual e remodelação tecidual, mas há mais do que somente esses estágios. Há o envolvimento de reações e interações entre células e mediadores; fatores intrínsecos e extrínsecos que também afetam a cicatrização (CORNELISSEN *et al.*, 1999; BROUGHTON II *et al.*,2006).

A fase inflamatória compreende o período imediato após a ferida até o 4º ou 6º dia e o colágeno exposto pela formação da ferida ativa a cascata de coagulação, iniciando a fase inflamatória. Após a ferida, ocorre a liberação de vasoconstritores como o tromboxano A2 e prostaglandina 2-α pelas membranas celulares. O coágulo formado é composto por colágeno, plaquetas, trombina, citocinas e fatores de crescimento. Neutrófilos e monócitos também estão presentes atravessando o vaso dilatado até o local da ferida. Monócitos também serão atraídos para a área da ferida transformando-se em macrófagos por volta de 48/96 horas. A ativação dos macrófagos é importante para a transição para a fase proliferativa. Macrófagos ativados irão mediar angiogênese, fibroplasia e síntese de NO. Várias enzimas e citocinas são liberadas pelos macrófagos como colagenases, ILs e TNF, os quais estimulam os fibroblastos a produzirem colágeno. Outras células presentes são os leucócitos (BROUGHTON II *et al.*,2006; EMING *et al.*, 2007).

Os fibroblastos palatais apresentam diferentes fenótipos em diferentes fases do processo de cicatrização. As diferenças parecem coincidir com mudanças na função de fibroblastos e miofibroblastos. Os miofibroblastos são uma espécie especializada de fibroblastos envolvidos na contração da ferida. Eles expressam a proteína actina alfa de músculo liso (α-SM actina) (VAN BEURDEN *et al.*, 2005). Os miofibroblastos causam a contração da matriz extracelular (CLARK, 1996) e estão

envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação de células epiteliais, vasculares e neurogênicas (SAUNDERS *et al*., 1992).

A fase proliferativa pode ir do 4º até o 14ºdia e tem como principais passos a epitelização, angiogênese e formação de tecido de granulação. Macrófagos e fibroblastos que atuam na deposição de colágeno iniciam o recobrimento da área da lesão e restauram sua integridade (CORNELISSEN *et al*., 1999; BROUGHTON II *et al*.,2006). Síntese, remodelação e deposição de moléculas da matriz extracelular são essenciais para iniciar o reparo e a progressão do estado cicatricial. Respostas celulares à lesão envolvem interações células-células e células-matriz, bem como contatos entre diferentes populações de células por mediadores (EMING *et al.,* 2007).

A lesão tecidual causa imediatamente uma inflamação aguda onde são encontrados mediadores inflamatórios como fatores de crescimento e citocinas necessários para o reparo (LEIBOVICH *et al*., 1972). A cronologia dos eventos que caracterizam a cicatrização é essencial para um reparo ótimo (EMING *et al*., 2007).

Imediatamente após a lesão, constituintes do sangue extravasam. Plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, PMNs) se unem e formam o coágulo liberando uma série de fatores que amplificam a resposta de agregação e iniciam a cascata de agregação e que agem como quimoatrativos para células envolvidas na fase inflamatória (SZPADERSKA *et al*., 2003). Dentro de poucas horas após a lesão, os neutrófilos transmigram através das células endoteliais e capilares sanguíneos, os quais foram ativados por citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e IFN-γ ao local da lesão levando à expressão de várias moléculas de adesão que são essenciais para a adesão e diapedese dos leucócitos, como P e E–selectinas, bem como ICAM-1 e 2 (KULIDJIAN *et al*., 1999). Quimocinas e seus receptores são cruciais no recrutamento de mediadores de neutrófilos durante o reparo. Produtos bacterianos como lipopolissacarídeos infectando a lesão podem acelerar a direção dos neutrófilos. Os neutrófilos recrutados começam o debridamento do tecido desvitalizado e fagocitose de agentes infecciosos. Os neutrófilos liberam uma grande quantidade de substâncias antimicrobianas como espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos catiônicos, eicosanóides e proteases como elastases e proteinases (WEISS, 1989). Apesar de seu papel relevante na defesa do organismo essas células podem ser benéficas ou não no processo de cicatrização. Ainda não

está muito claro se a diminuição de neutrófilos no local da lesão acelera a reepitelização ou a presença de outras células inflamatórias, como macrófagos, são responsáveis pela aceleração do processo de reepitelização (EMING *et al.*, 2007).

Ao menos que o recrutamento de neutrófilos continue na lesão, a infiltração cessa em poucos dias, os remanescentes são fagocitados por macrófagos que se instalam no local da lesão dentro de 2 dias. Apesar dos macrófagos residentes, a maior parte deles, no local, são recrutados do sangue. A infiltração de macrófagos é regulada por fatores de quimioatração, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (FRANK *et al.*, 2000). As maiores fontes destes quimioatrativos são plaquetas, queratinócitos hiperproliferativos, fibroblastos e leucócitos. Como os macrófagos extravasam do sangue eles se tornam ativos e maduros nos tecidos (GORDON, 2003). Apesar de sua função imunológica de célula apresentadora de antígeno e fagócito, durante a cicatrização, macrófagos têm papel relevante no processo de cicatrização através da síntese de numerosos fatores de crescimento como fator de crescimento de transformação (TGF-β e TGF-α), fatores de crescimento básico de fibroblastos, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento endotelial vascular, os quais promovem proliferação célula e síntese de matriz extracelular. O sucesso do reparo da lesão tecidual está na resolução da resposta inflamatória (EMING *et al.*, 2007).

Epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno são etapas muito importantes na cicatrização. Epitelização ocorre logo na cicatrização. A angiogênese estimulada por TNF-α é marcada por migração celular e por formação de capilares, essa formação é crítica para a cicatrização. A fase de granulação e deposição de tecido requerem nutrientes fornecidos pelos capilares. A epitelização começa após a lesão e é primeiramente estimulada por citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF-α estimulando também fatores de crescimento de queratinócitos (XIA *et al.*, 1999).

A parte final da fase proliferativa é formação do tecido de granulação. Fibroblastos migram da região da borda da lesão, tornando-se ativados, proliferando e sintetizando colágeno. Fatores derivados de plaquetas e de crescimento epidermal são os principais sinalizadores dos fibroblastos e são derivados de plaquetas e macrófagos. Os fibroblastos estimulados por TGF-β1 secretados por macrófagos se transformam em miofibroblastos (EMING *et al.*, 2007).

Clinicamente a terceira fase, a fase de maturação e remodelação pode ser considerada a mais importante. A principal característica dessa fase é a deposição de colágeno de uma forma organizada. Essa fase pode durar de 8 dias até 1 ano. Se pacientes apresentarem problemas na deposição de matriz a cicatrização pode ficar comprometida (CORNELISSEN *et al.,* 1999; BROUGHTON II *et al*., 2006).

1.18. O Uso de Plantas no Desenvolvimento de Medicamentos

Necessidade de inovação e tratamento para doenças que continuam sem tratamentos adequados, entre outros fatores como vantagens competitivas, têm levado as indústrias farmacêuticas a investirem recursos no desenvolvimento de novos medicamentos. É grande o interesse das indústrias no uso de substâncias naturais como fontes de novos medicamentos (CALIXTO, 2000).

Devido aos elevados custos e tempo de pesquisa para o desenvolvimento de um novo medicamento o preço final acaba sendo elevado ao consumidor. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 35 a 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre especialmente às plantas medicinais. A própria OMS reconhece e estimula o uso de plantas medicinais pela população em países pobres, mas com cuidados especiais no seu uso. A utilização das plantas como fonte de medicamentos nas sociedades pré-industrializadas e agrárias era um fato comum (CALIXTO, 2000; STROHL, 2000).

Os compostos produzidos pelas plantas a partir de moléculas essenciais à sua vida, como carboidratos, proteínas e lipídeos são chamados de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários eram considerados produtos de excreção do vegetal sem possuir função definida, sendo negligenciado seu estudo científico por muito tempo. Atualmente, suas funções já foram reconhecidas, por exemplo: defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios ultra-violeta (UV) e atração de polinizadores. Essas substâncias são divididas em grupos de acordo com suas estruturas e/ou origem biogênica (PHILLIPSON, 1999; STROHL, 2000).

Embora as plantas medicinais sejam utilizadas freqüentemente para tratamento e estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos (MANTLE *et al*., 2001), este recurso é ainda pouco explorado: a atividade biológica foi avaliada

somente em 6% das 250.000 espécies de plantas identificadas no mundo (RATES, 2001; VERPOORTE *et al.*, 2002).

1.18.1. M. sylvestris Linn

Nome científico *M. sylvestris* L. (Fig. 3), família botânica Malvaceae. É uma Malvácea herbácea, anual, dispersa nos continentes europeu, africano e americano, freqüente nos campos, caminhos e entulhos (SIMÕES *et al.*, 2004; COSTA, 2002).

É uma planta ereta, pubescente, com sua raiz principal perpendicular, grossa, fusiforme, branca, carnuda, e de raízes secundárias finas; caule ereto ou ascendente, ramoso, de 60 a 90 cm de altura. Folhas verdes, moles, macias ao tato, pubescentes, com cinco a sete lóbulos pouco profundos. As flores são pediceladas com numerosos pêlos patentes; corola de cinco pétalas livres, maiores que o cálice, chanfradas, coradas de rosa-violáceo, raiadas de vermelho e estames numerosos. As folhas e flores são inodoras e possuem sabor mucilaginoso. No exame microscópico verifica-se a existência de numerosas células de mucilagem em toda a planta, abundantes no parênquima foliar e mais nas sépalas e pétalas. Utilizam-se da *M. sylvestris* as raízes, folhas e flores. As folhas geralmente são colhidas no período de floração e as raízes no outono (COSTA, 2002).

Os polissacarídeos, em concentrações de 5% a 10%, são semelhantes aos encontrados para as demais plantas da família Malvaceae. Para as flores é relatada a presença de flavonóides, antocianidinas e leucoantocianidinas. Nas folhas foram detectados flavonóides sulfatados. As mucilagens encontradas nas folhas (8,2%) e nas flores (6,1%) contêm ácido D-galacturônico, D-galactose, glucose, L-arabinose, xilose e L-ramnose. As quantidades destes constituintes nas duas mucilagens são semelhantes. Na planta identificaram-se ainda malvona A (fitoalexina), taninos e vitaminas A, B1, B2, B9 e C. A cor das flores resulta de um antocianósido, o malvósido (FARINA *et al.,* 1995; SIMÕES *et al.*, 2004; COSTA, 2002, VESHKUROVA *et al.*, 2006).

Existem ainda terpenóides como sesquiterpenos, diterpenos, monoterpenos na composição química da *M. sylvestris* (CUTILLO *et al.,* 2006).

Avaliações farmacológicas realizadas especificamente com infusos de malva são raras, baseando-se, principalmente na correlação dos constituintes presentes.

Preparações das folhas e flores dessecadas de malva, especialmente na forma de infusos, são empregadas pelas propriedades emolientes, que se devem às mucilagens, na redução e/ou alívio do estímulo do catarro nas vias respiratórias superiores em estados inflamatórios das mucosas e faríngea. O extrato hidroalcoólico das flores e folhas de *M. sylvestris* têm sido amplamente utilizado no alívio de tosses e doenças inflamatórias da mucosa e abscessos dentários. As folhas possuem ainda propriedades ocitócicas e ligeiramente hiperglicemiantes. As raízes, menos mucilaginosas, são utilizadas com pouca freqüência (FARINA, 1995; SIMÕES *et al.*, 2004; COSTA, 2002; GUARRERA, 2005).

Fig. 3. *Malva sylvestris* Linn

2. JUSTIFICATIVA

Devido à dificuldade de se tratar condições inflamatórias como doenças periodontais e cicatrização de algumas lesões na região bucal, a utilização de agentes coadjuvantes, com atividades antiinflamatória e cicatrizante, no tratamento dessas alterações, torna-se de grande interesse. O uso de fitoterápicos pela população aumenta a cada dia, ressaltando mais a importância da avaliação das propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes da *M. sylvestris.*

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo principal avaliar, de forma pré-clínica, o potencial antiinflamatório e cicatrizante da *M. sylvestris* L. em alterações bucais, utilizando protocolos experimentais de doença periodontal e cicatrização de lesão palatina em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o potencial antiinflamatório do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* na doença periodontal induzida por ligadura, em ratos, através da análise da atividade das enzimas Mieloperoxidase (MPO), N-acetil-β-D-glucosaminase (NAG), análise morfométrica e radiográfica da reabsorção óssea;
- verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* em cultura de fibroblastos de gengiva de ratos na liberação de óxido nítrico (NO) induzido por LPS;
- verificar a ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* através de lesão palatina em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Material Vegetal

O material vegetal foi fornecido por Quimer Ervas Medicinais – São Paulo; O extrato hidroalcoólico foi preparado pelo professor Moacir Pizzolatti do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, a partir das folhas secas da *M. sylvestris*.

As folhas de *M. sylvestris* (3 kg) foram submetidas à extração por maceração exaustiva com EtOH/ H_2O (EtOH 96%), a temperatura ambiente, durante uma semana. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor sob pressão reduzida, a 50 ºC, até 1/3 de seu volume inicial. O extrato hidroalcóolico foi mantido em repouso por alguns dias a 4 ºC. Logo após, notou-se o aparecimento de um resíduo sólido, diante este fato, foi realizada uma filtração para separar este resíduo sólido do restante do extrato, conforme mostrado na figura 4. O protocolo de extração foi adaptado de RYOKO *et al.*, 1990; POURRAT *et al.*, 1990; BILLETER *et al.*, 1991; CUTILLO *et al.*, 2006.

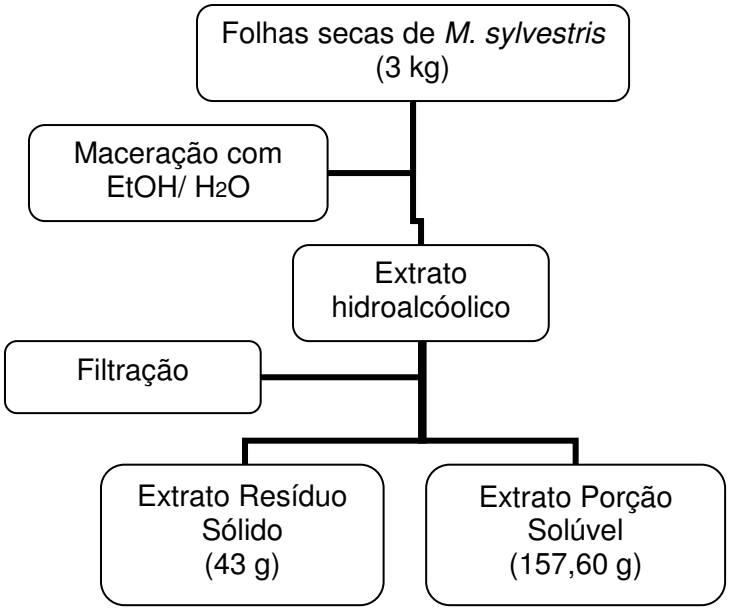


Fig. 4. Esquema da obtenção do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* a partir das folhas secas.

4.1.2. Animais

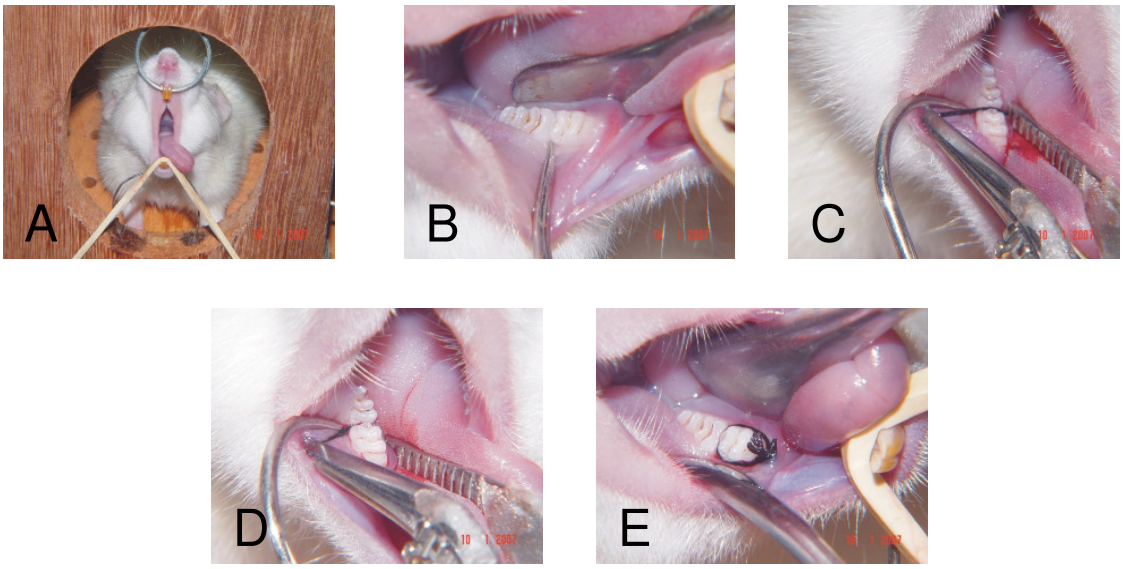
Em todos os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, fêmeas e machos, pesando entre 180-300 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de 4 animais por caixa. Os experimentos foram realizados preferencialmente no período da manhã. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná com o protocolo de número 205 (ZIMMERMANN, 1983).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Indução da Doença Periodontal com Ligadura

Neste protocolo experimental utilizou-se a metodologia de BJÖRNSSON *et al*. (2003) modificada (Prancha 1). A ligadura consiste em amarrar um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores, direito e esquerdo, objetivando acúmulo de biofilme dental. Os animais foram ambientados, pesados, anestesiados com cetamina (0,1 ml/100 g) e xilazina (0,1 ml/100 g) e divididos em 6 grupos (N=6-8): Ligadura+Gel (onde foi realizada a ligadura e os animais tratados com gel de natrosol, o veículo, na dose de 25 mg/dente), Ligadura+*M. sylvestris* (realizada ligadura e tratado com 20% de extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* incorporado ao gel de natrosol na dose de 25 mg/dente); Ligadura+Clorexidina (realizada ligadura e tratado com clorexidina 2% na dose de 25 mg/dente); Ligadura+Indometacina (realizada ligadura e tratado 5 mg/kg de indometacina incorporada ao gel de natrosol na dose de 25 mg/dente), Sham (falso operado e tratado com gel de natrosol na dose de 25 mg/dente) e Naive (grupo sem procedimento).

Todos os animais dos grupos foram tratados tópica e diariamente (uma vez ao dia) por 7, 15 e 30 dias, com exceção do grupo Ligadura+Indometacina, que só foi tratado por 30 dias. O dia da colocação da ligadura foi considerado o dia 0, o dia seguinte 1, onde foi iniciado o tratamento. Os animais foram eutanasiados nos dias 8, 16 e 31. As hemi-mandíbulas foram retiradas para o exame morfométrico, radiográfico e ensaios enzimáticos.



Prancha 1. A - Suporte para os animais para realizar a ligadura. B – Apoio para o dente. C – Início da passagem do fio no espaço interproximal. D – Passagem do fio. E – Ligadura realizada.

4.2.2. Determinação da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares foi determinada tanto nas gengivas de regiões onde foi feito ligadura, quanto no tecido da região palatina submetido à lesão. Às biópsias (partes de 5 mm de tecido da gengiva dos ratos e tecido do palato) foram adicionados a 0,75 mL de solução fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 μL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 200 μL de uma mistura contendo 100 μL de solução fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 μL, PBS 0,22 M pH 5,4 e 15 μL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min e a reação interrompida pela adição de 30 μL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas na absorbância de 630 nm e expressa como mDO/biópsia (BRADLEY *et* al., 1982).

4.2.3. Determinação da Atividade da Enzima N-acetil-β-D- glucosaminidase (NAG)

A atividade da enzima NAG, utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares foi determinada tanto nas gengivas de regiões onde foi feito ligadura, quanto no tecido da região palatina submetido à lesão. Às biópsias (partes de 5 mm de tecido da gengiva dos ratos e palato) foram adicionados a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e

centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de p-nitrofenil-acetamida-µ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) e 100 µL de tampão citrato. A seguir a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 100 µL de tampão de glicina em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas, em absorbância de 405 nm e expressa como mDO/biópsia (SANCHEZ E MORENO, 1999).

4.2.4. Verificação da Perda Óssea Periodontal – Exame Morfométrico

Após a retirada do tecido gengival da região das hemi-mandíbulas, para análise enzimática, a parte óssea subjacente foi submetida a procedimento de fervura em água por 5 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10V ou 3% por 48 horas. Depois das amostras estarem bem secas elas foram coradas por 1 minuto com azul de metileno (1g/100 mL), para delinear a linha da junção esmalte-cemento. O método utilizado para quantificar a perda óssea periodontal foi adaptado de BJÖRNSSON *et al*. (2003). As amostras foram fotografadas em Câmera Digital Sony Cybershot DSC 707, 5.0, Sony Brasil Ltda, salvas em um computador e as medidas da área (em mm^2) localizada entre a junção esmalte-cemento e a borda de osso alveolar remanescente, na região lingual, foram feitas pelo programa Digital Image Tool 3.0. As análises foram realizadas em todos os grupos de animais tratados.

4.2.5. Análise do Percentual de Suporte Ósseo Periodontal – Exame Radiográfico

As mandíbulas foram radiografadas no Laboratório de Radiologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa utilizando o aparelho de raios X GENDEX 765 DC (Gendex Dental X-Ray Division. Dentsplay International Inc., Des Plaines, IL – USA) com fatores enrgéticos de 65 kVp e 7 mA. As amostras foram posicionadas sobre a face ativa do sensor digital de maneira que as faces proximais ficassem

paralelas ao feixe central de radiação e perpendicular ao sensor. O tempo de exposição foi de 0,32 s, com distância do cone de radiação em relação à amostra de 38 cm.

As imagens radiográficas foram armazenadas e identificadas e a mensuração do remanescente ósseo foi realizada, com o software Image Pro-Plus, nas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior, de acordo com o método de Souza *et al.*, 2005 adaptado.

Nas radiografias digitais, foram considerados três pontos: ápice da raiz distal/mesial (A), ponta de cúspide mesial/distal (B) e crista óssea na distal/mesial do dente (C). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB, para que fosse calculado o percentual de suporte ósseo periodontal (PSO) junto a raiz, por meio da fórmula matemática: PSO(%)= [AC-cos(CÂB)x100]/AB, como pode ser observado na figura 5.

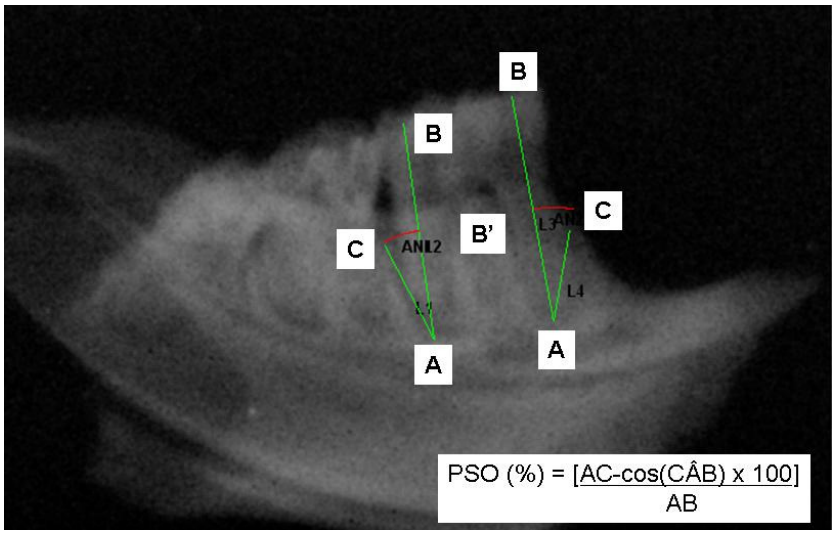


Fig 5. Demonstração da forma como foi calculado o percentual de suporte ósseo (PSO) junto à raiz e a fórmula matemática para o cálculo.

4.2.6. Cultura de Fibroblastos Gengivais e Quantificação de NO

Biópsias de gengiva dos ratos foram retiradas e lavadas em capela de fluxo laminar seguindo a seqüência: solução de PBS; álcool 70º por 30 segundos; solução de PBS com antibiótico (Penicilina G + Estreptomicina) a 1% por 2 min e solução de PBS novamente. Os fragmentos de tecido foram incubados em 4 mL de colagenase 1 mg/mL, durante aproximadamente duas horas. Após esse tempo foi acrescentado 2 mL de meio de cultura completo (meio Dulbecco Mem (DMEM) - Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e o conteúdo da placa foi centrifgado durante 15 min a 1500 rpm. O pellet de células foi ressuspendido em meio completo e então incubado a 37ºC e CO_2 a 5% até subconfluência. Após atingirem subconfluência, a cultura foi repicada ressuspendendo as células com o uso de tripsina e passadas para nova placa. As células foram utilizadas para testes experimentais após quatro passagens. O protocolo foi adaptado de KEILA *et al.* (2004).

Os fibroblastos cultivados foram colocados na proporção de 2 x 10^6 células por poço (placa de 24 poços) e estimulados por 24 horas, com LPS, nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 µg/mL. A quantidade de NO gerado após a sensibilização com LPS foi feita através da dosagem de NO e seus subprodutos, nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}).

Foram colocados 100 µL do sobrenadante de cada poço misturados a 100 µL de reagente de Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 10%/ naftil-etilediamina 0,1% em água Mili-Q) em outra placa antes da medição a 570 nm. Curvas padrão de nitrito e nitrato foram realizadas.

Após a verificação de qual concentração de LPS promovia maior liberação de NO, novamente 2 x 10^6 células por poço foram incubadas com LPS (1 µg/mL) junto com a concentração de 0,1 a 10 µg/mL do extrato hidroalcóolico de *M. sylvestris* por 24 horas e analisado a quantidade de NO e seus substratos.

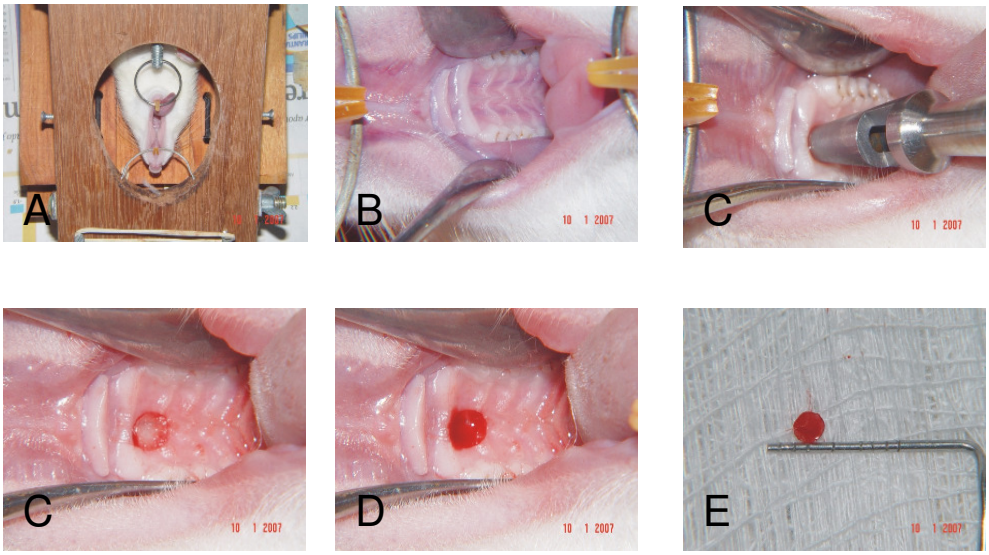
Nesse experimento também foi verificada a viabilidade celular pelo método do MTT. O princípio desse método consiste na absorção do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio] MTT (Sigma®) pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. Este produto é armazenado dentro da célula e extraído através da adição de um solvente

apropriado. Após incubação de 24 horas das células com os compostos, o meio de cultura foi substituído por outro sem soro fetal bovino contendo o corante MTT (1 mg/mL). As células foram incubadas durante 3 a 4 horas (37ºC), tempo necessário para a redução do corante. Em seguida o meio foi retirado cuidadosamente sendo adicionados 1 mL de etanol P.A. para solubilização do Formazan. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente foi mediada no leitor de placas a 570 nm. A absorbância das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (SILVA *et al.*, 2004).

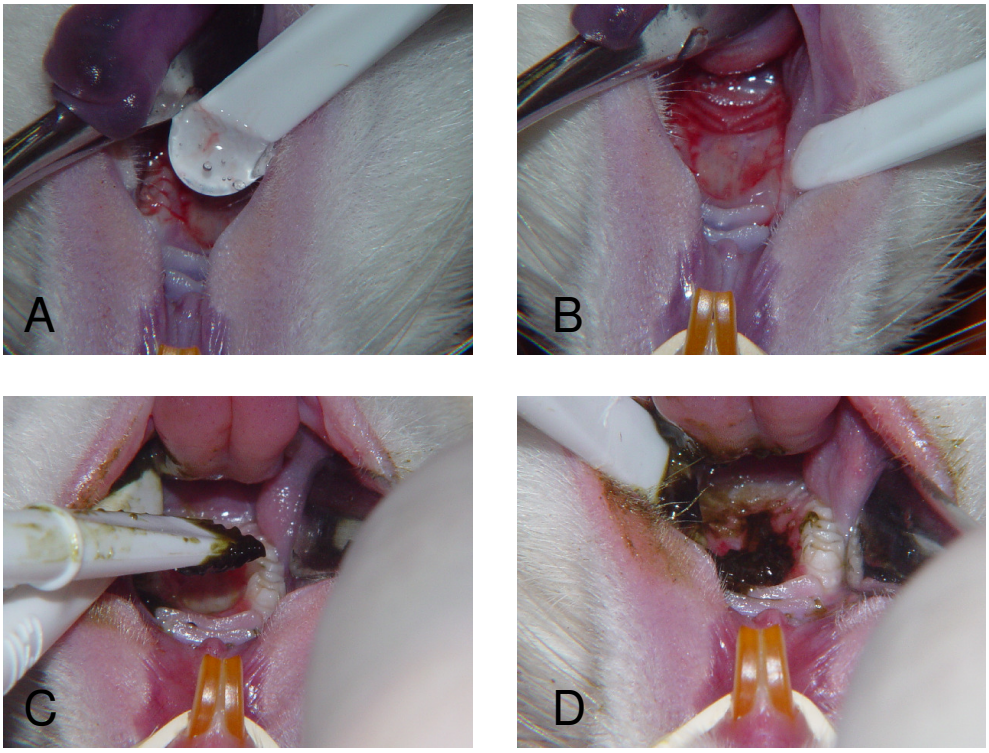
4.2.7. Verificação da Ação Cicatrizante da M. sylvestris

Nos mesmos grupos utilizados para a indução da doença periodontal com ligadura, foram realizados procedimentos para verificar a ação cicatrizante da *M. sylvestris* em lesão palatina. Os grupos foram os seguintes (N=8): Lesão+Gel (onde foi realizada a lesão e os animais tratados com gel de natrosol, o veículo, na dose de 50 mg/lesão), Lesão+*M. sylvestris* (realizada lesão e tratado com 20% de extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* incorporado ao gel de natrosol na dose de 50 mg/lesão); Ligadura+Clorexidina (realizada ligadura e tratado com clorexidina 2% na dose de 50 mg/dente); Sham (lesão sem tratamento) e Naive (grupo sem procedimento).

O experimento foi realizado, inicialmente, procedendo a marcação da região no palato dos animais com o Punch de 2 mm (Prancha 2). Após a marcação foi realizada a excisão do tecido da região. O dia no qual foi realizada a lesão foi considerado dia 0 e os animais começaram e ser tratados no dia seguinte a excisão o dia 1. Os animais foram tratados do dia 1 ao 7 e 1 ao 15 (Prancha 3), eutanasiados no dia 8 e 16, para retirada das amostras da região da maxila para ensaios enzimáticos. As medidas do processo de cicatrização foram feitas, em todos os animais de todos os grupos, com um compasso de duas pontas secas (Trident) e as medidas transpostas para micrômetro digital (GREAT, MT – 04513), nos dias 2, 4, 6 e 8 (dia da retirada das amostras), para os tratados por 07 dias. As medidas dos tratados por 15 dias foram feitas nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12.



Prancha 2. A – Posição dos animais para realizar o procedimento. B – Palato. C – Marcação do local com Punch. D – Palato marcado. E – Aspecto do local da excisão. F – Excisão.



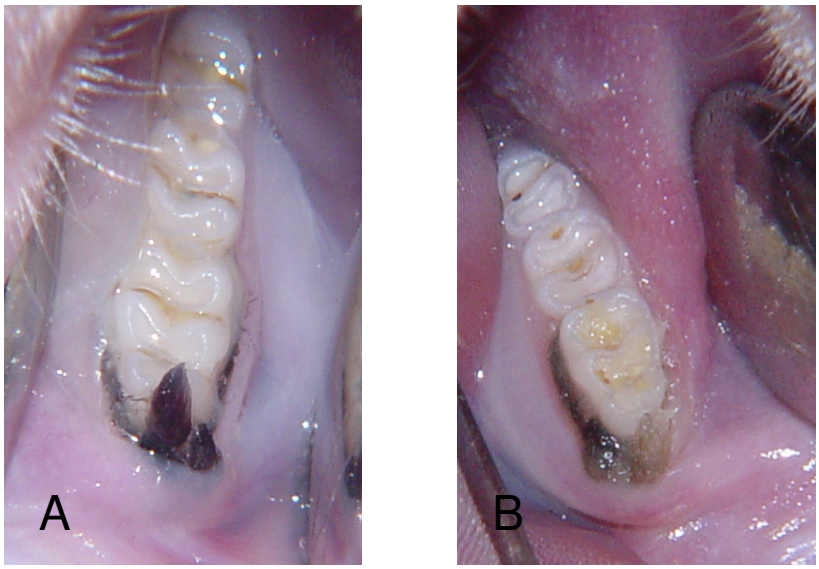
Prancha 3. A – Colocação de 50 mg de gel de natrosol sobre o local da lesão palatina. B – Aspecto da lesão palatina após colocação do gel. C - Colocação de 50 mg da *M. sylvestris+*gel na lesão palatina. D – Aspecto da *M. sylvestris+*gel sobre a lesão palatina.

4.3. Análise Estatística

Os dados registrados foram avaliados por análise de variância entre os grupos (ANOVA - one way) seguidos por teste de Bonferroni para comparação entre os grupos. O nível de significância considerado foi de 5%.

5. RESULTADOS

A prancha 4 mostra o acúmulo de biofilme dental ao redor da ligadura nos primeiros molares inferiores dos animais em 7 e 15 dias. O biofilme não foi analisado qualitativamente ou quantitativamente.



Prancha 4. A – Presença de biofilme dental sobre a ligadura, 07 dias. B – Biofilme dental sobre a ligadura, 15 dias.

5.1. Análise Enzimática – MPO - na indução da doença periodontal

A figura 6 representa a avaliação da atividade da enzima MPO na doença periodontal induzida em 7 dias. Os grupos tratados com *M. sylvestris* e Clorexidina não apresentaram diferença estatística significante com o grupo onde foi induzida a doença periodontal com ligadura e só foi utilizado veículo (gel). Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$). Os resultados sugerem que em 7 dias não houve tempo suficiente para os tratamentos produzirem efeito, possivelmete pelo trauma causado no local durante o procedimento.

A figura 7 mostra a avaliação da atividade da enzima MPO na doença periodontal induzida por ligadura em 15 dias. Nenhum dos grupos, inclusive os tratados com *M. sylvestris* e Clorexidina, apresentaram diferença estatística com o grupo Ligadura+Gel. Mostrando que em 15 dias houve um incício do estado crônico, sendo os polimorfonucleares substituídos por outras células, presentes em maior quantidade.

A figura 8 mostra a avaliação da atividade da enzima MPO na doença periodontal induzida por ligadura em 30 dias. Com o estado crônico estabelecido o grupo Ligadura+*M. sylvestris*, Ligadura+Clorexidina e Ligadura+Indometacina apresentaram diferença estatística significante com o grupo Ligadura+Gel na redução da atividade da enzima MPO ($p<0,01$).

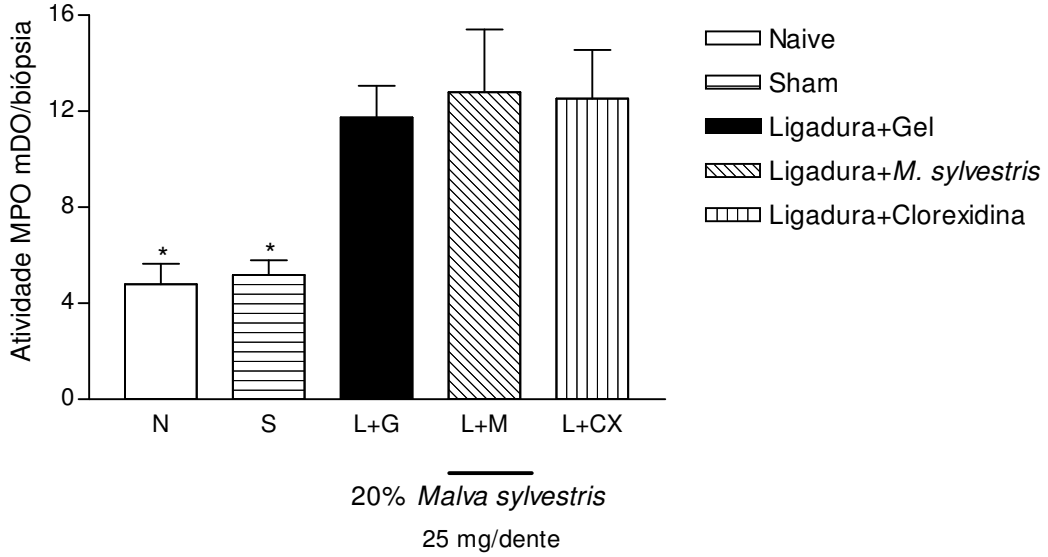


Fig 6. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na atividade da enzima mieloperoxidase (indicativo da presença de polimorfonucleares), em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 07 dias de indução e tratamento. *p<0,05 considerado significante em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

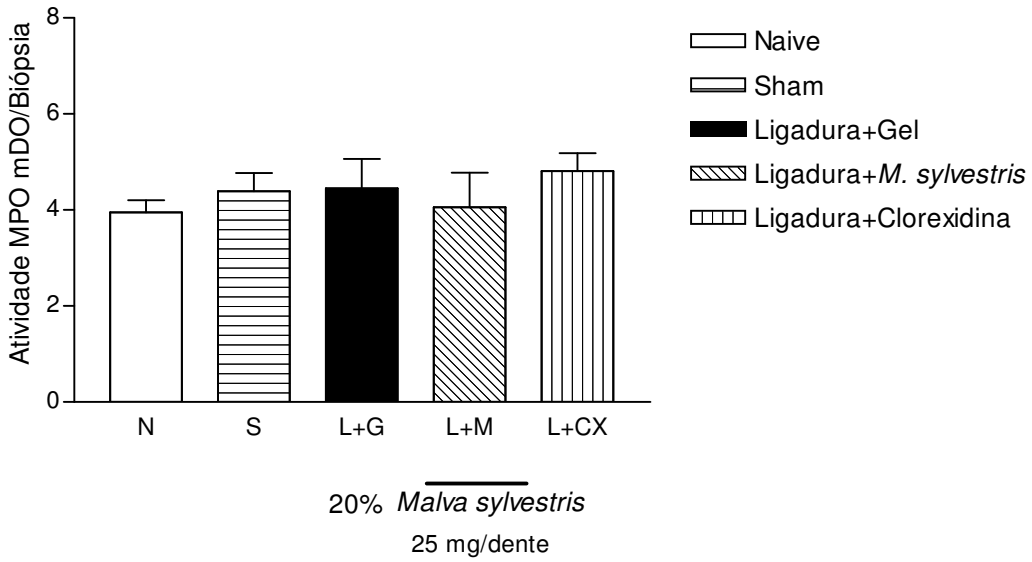


Fig 7. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na atividade da enzima mieloperoxidase (indicativo da presença de polimorfonucleares), em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 15 dias de indução e tratamento. Os dados representam a média ± EPM.

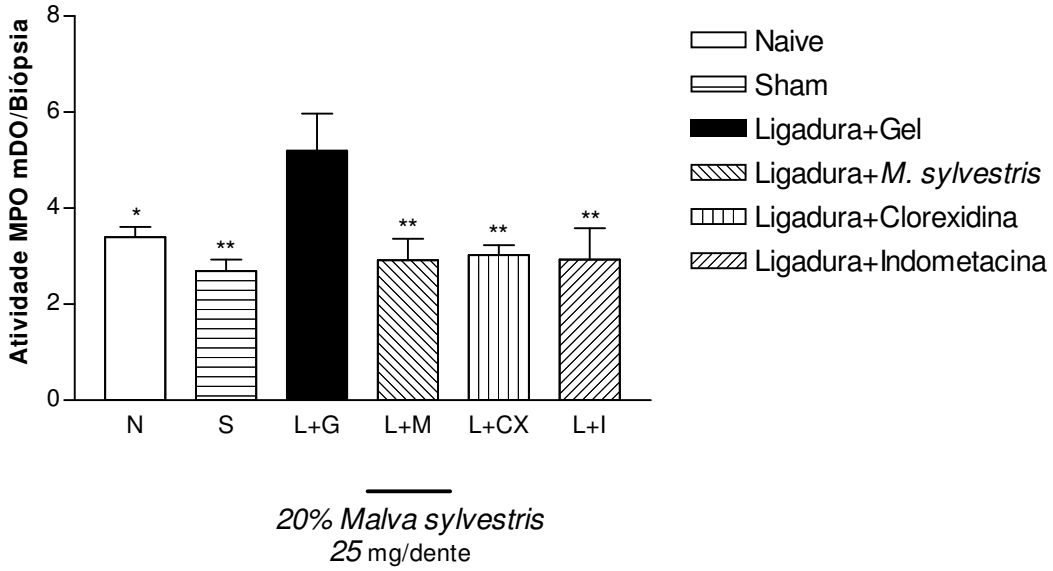


Fig 8 Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na atividade da enzima mieloperoxidase (indicativo da presença de polimorfonucleares), em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 30 dias de indução e tratamento. *p<0,05, **p<0,01 considerados significantes em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

5.2. Análise Enzimática – NAG - na indução da doença periodontal

A figura 9 representa a avaliação da atividade da NAG na doença periodontal induzida em 7 dias. Os grupos tratados com *M. sylvestris* e Clorexidina não apresentaram diferença estatística significante com o grupo onde foi induzida a doença periodontal com ligadura e só foi utilizado veículo (gel de natrosol). O grupo Naive foi o único que apresentou diferença estatística significativa ($p<0,001$) em relação ao grupo Ligadura+Gel. Em estados agudos, não há presença significativa de mononucleares, sugerindo a não diferença nos grupos tratados.

A figura 10 mostra a avaliação da atividade da NAG na doença periodontal induzida por ligadura em 15 dias. O grupo tratado com *M. sylvestris* apresentou diferença estatística significante ($p<0,01$) comparada ao grupo Ligadura+Gel. O grupo Ligadura+Clorexidina apresentou diferença estatística com o grupo Ligadura+Gel ($p<0,05$). Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística significante, ($p<0,001$) e ($p<0,01$) respectivamente, em relação ao grupo Ligadura+Gel. Mostrando o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* em mononucleares no início do estado crônico.

A figura 11 mostra a avaliação da atividade da NAG na doença periodontal induzida por ligadura em 30 dias. Os grupos tratados com *M. sylvestris,* Clorexidina e Indometacina apresentaram diferença estatística significante ($p<0,05$) comparado ao grupo Ligadura+Gel. Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística significante ($p<0,01$) em relação ao grupo Ligadura+Gel. Mostrando o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* na redução atividade da enzima NAG, indicativa da presença de mononucleares no estado crônico.

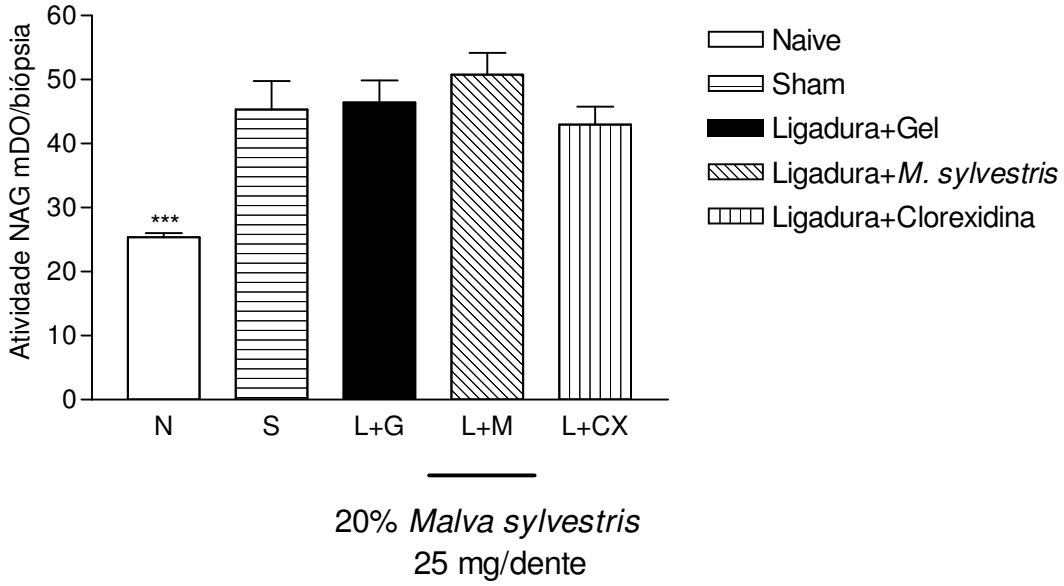


Fig 9. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na NAG (indicativo da presença de mononucleares), em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 7 dias de indução e tratamento. ***p<0,001 considerado significante em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

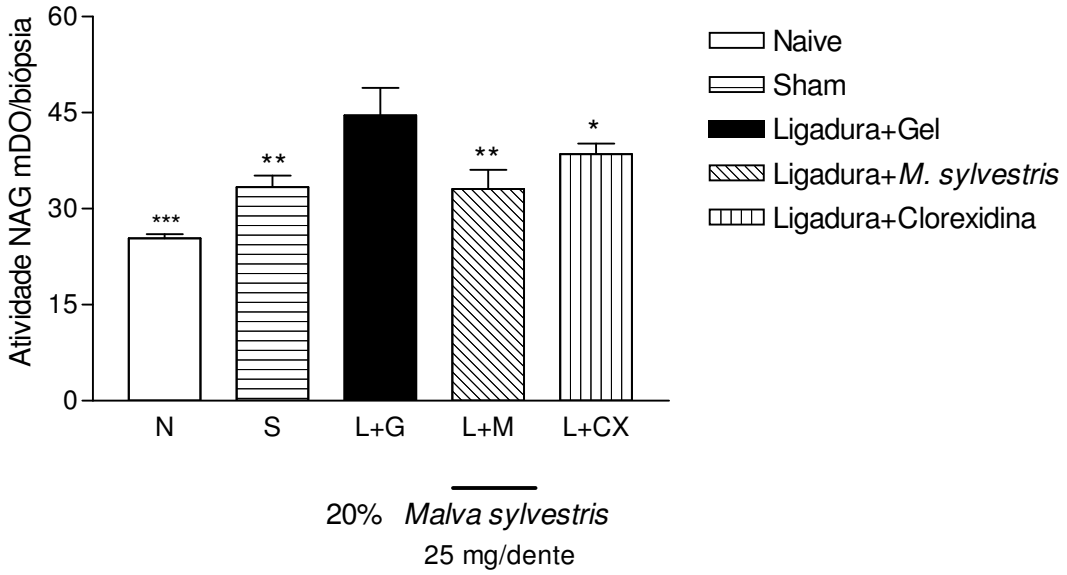


Fig 10. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na NAG (N-acetil-β-D-glucosaminase) em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 15 dias de indução e tratamento. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, considerados significantes em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

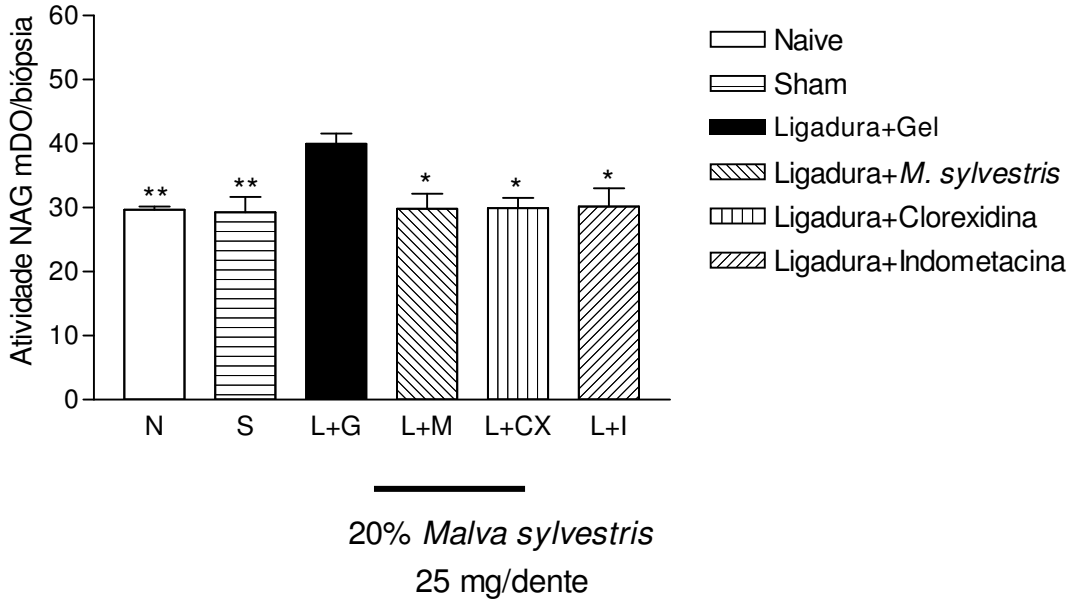


Fig 11. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na atividade da enzima NAG (N-acetil-β-D-glucosaminase) em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 30 dias de indução e tratamento. *p<0,05, **p<0,01 considerados significantes em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

5.3. Análise Morfométrica

As pranchas 5, 6 e 7 mostram as fotos das mandíbulas a partir das quais foi feito o exame morfométrico, respectivamente em 7, 15 e 30 dias.

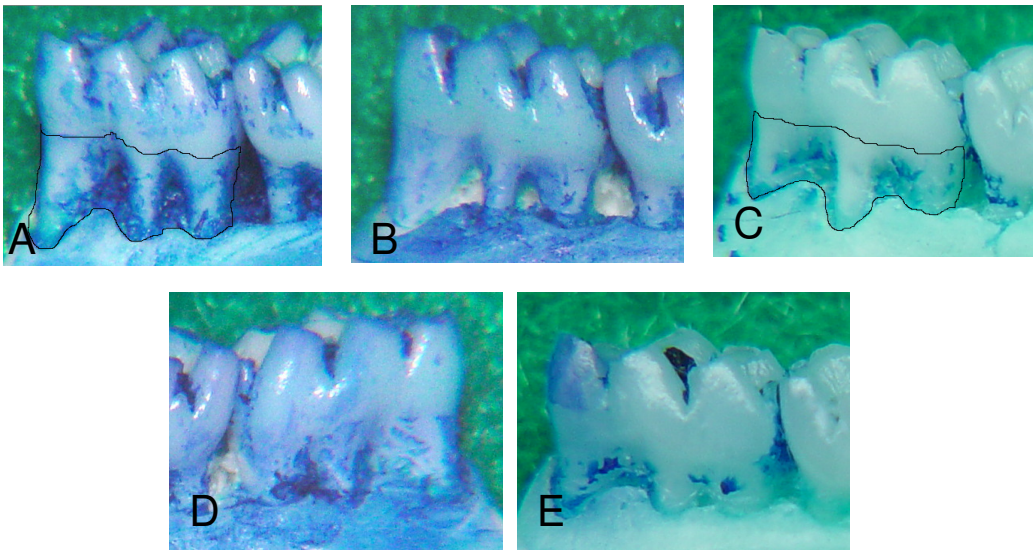
A figura 12 mostra a reprodutibilidade intra-examinador, através do gráfico de Bland-Altman, a partir de dados obtidos no exame morfométrico, em dois diferentes momentos. A maioria das medidas está dentro dos limites de concordância.

A figura 13 representa reabsorção óssea na doença periodontal induzida em 7 dias. O grupo tratado com *M. sylvestris* não apresentou diferença estatística significante com o grupo Ligadura+Gel. O grupo tratado com Clorexidina não apresentou diferença estatística significante ao ser comparado com o grupo Ligadura+Gel. Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística significante ($p<0,001$) e ($p<0,01$) respectivamente, em relação ao Liagadura+Gel.

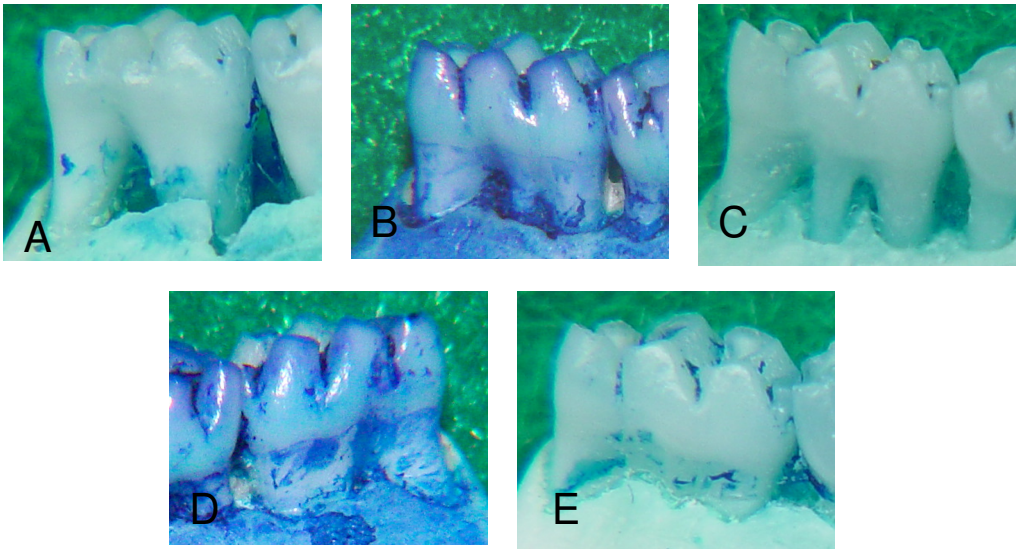
A figura 14 mostra a reabsorção óssea na doença periodontal induzida por ligadura em 15 dias. Os grupos tratados com *M. sylvestris* e Clorexidina apresentaram diferença estatística significante, ($p<0,01$) e ($p<0,001$) respectivamente, comparadas ao grupo Ligadura+Gel. Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística significante ($p<0,001$) em relação ao grupo Ligadura+Gel.

Os resultados apresentados pela figura 15 mostram o efeito do extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris* na reabsorção óssea em doença periodontal induzida por ligadura, em 30 dias. Os resultados mostram que o grupo Ligadura+*M. sylvestris* apresentou diferença estatística significante em relação ao grupo Ligadura+Gel ($p<0,05$), de forma a diminuir a reabsorção óssea. Os grupos Naive e Sham apresentaram diferença estatística com o grupo Ligadura+Gel ($p<0,001$). Os grupos Ligadura+Clorexidina e Ligadura+Indometacina não apresentaram diferença estatística com o grupo Ligadura+Gel.

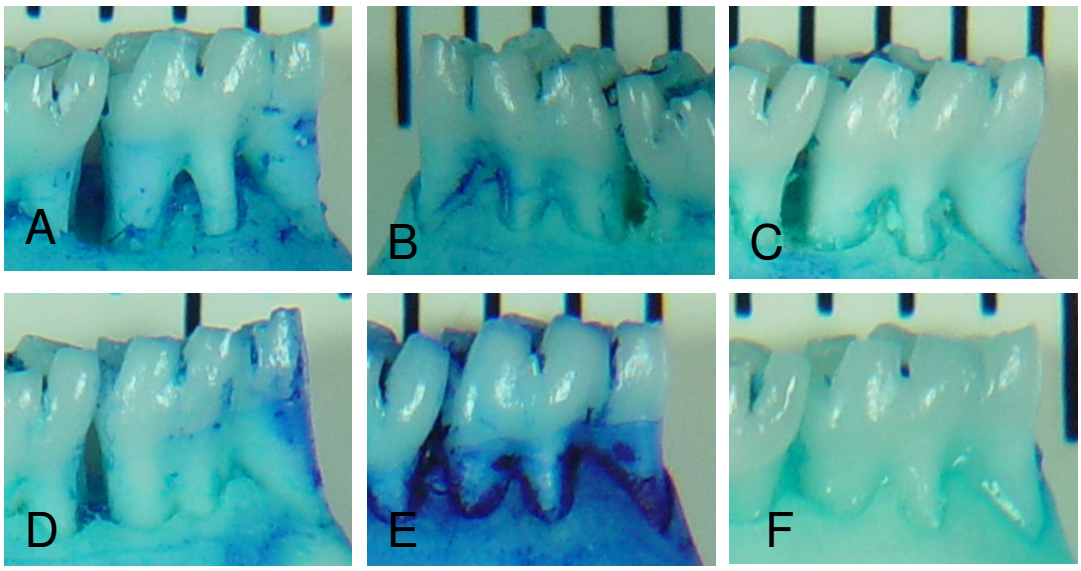
Mostrando o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* na inibição da reabsorção óssea horizontal a partir de 15 dias do início do tratamento.



Prancha 5. Análise da perda óssea periodontal dos animais submetidos à ligadura, tratados por 07 dias e o grupo basal. A – Área da região lingual dos animais do grupo Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris*. C – Ligadura+Clorexidina. D – Sham. E – Naive.



Prancha 6. Análise da perda óssea periodontal dos animais submetidos à ligadura, tratados por 15 dias e o grupo basal. A – Área da região lingual dos animais do grupo Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris*. C – Ligadura+Clorexidina. D –Sham. E – Naive.



Prancha 7. Análise da perda óssea periodontal dos animais submetidos à ligadura, tratados por 30 dias e o grupo basal. A – Área da região lingual dos animais do grupo Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris*. C – Ligadura+Clorexidina. D – Ligadura+Indometacina. E – Sham. F – Naive.

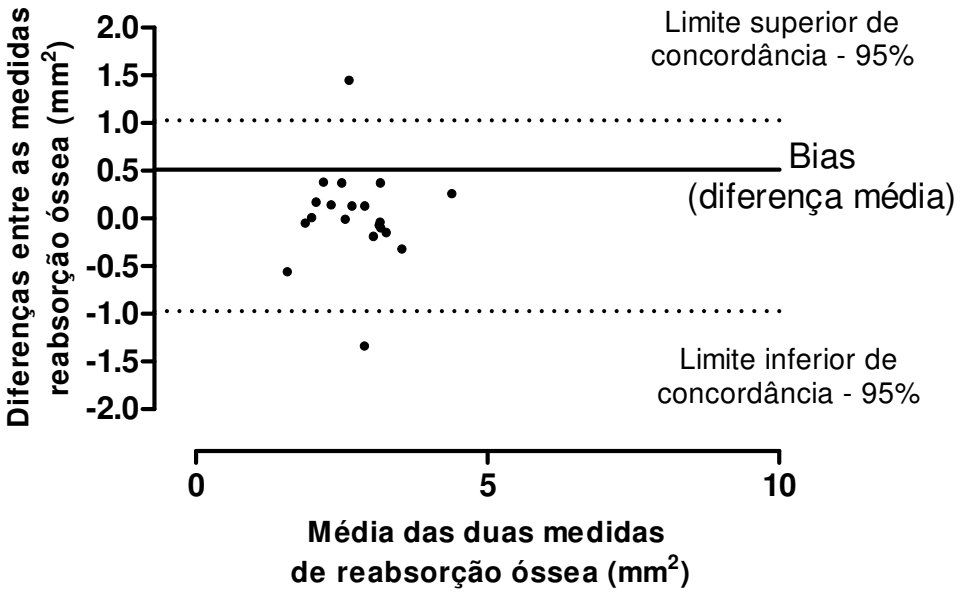


Fig 12. Reprodutibilidade intra-examinador. Gráfico de Bland-Altman dos dados obtidos com medidas da área de reabsorção óssea (mm^2), realizada pelo exame morfométrico, em dois diferentes momentos. Maioria das medidas dentro dos limite de concordância.

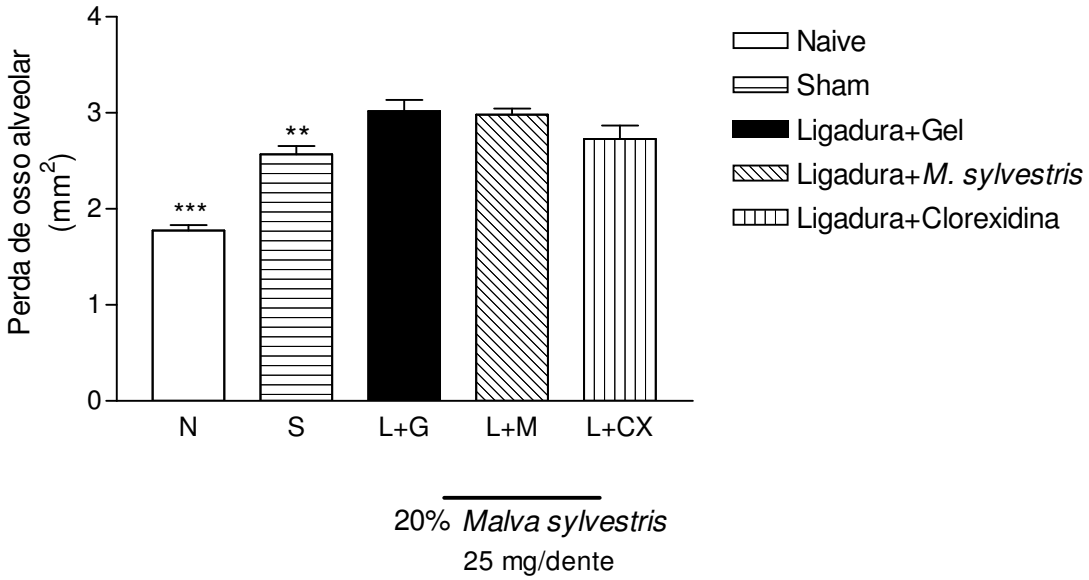


Fig 13. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na reabsorção óssea periodontal em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 07 dias de indução e tratamento. **p<0,01, ***p<0,001 representam significância em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

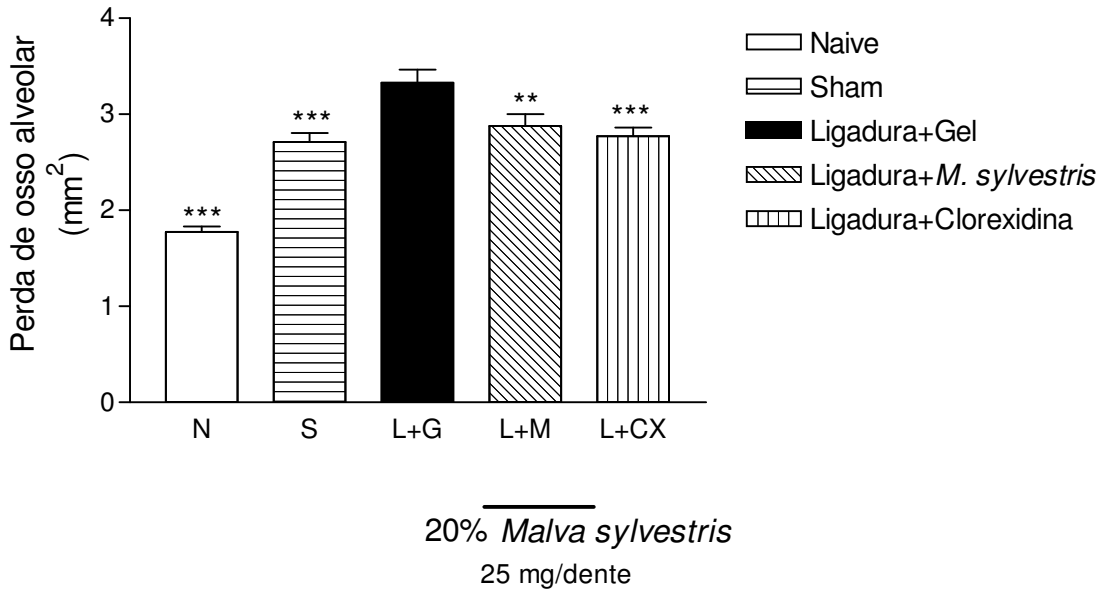


Fig 14. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na reabsorção óssea periodontal, em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 15 dias de indução e tratamento. **p<0,01, ***p<0,001 representam significância em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

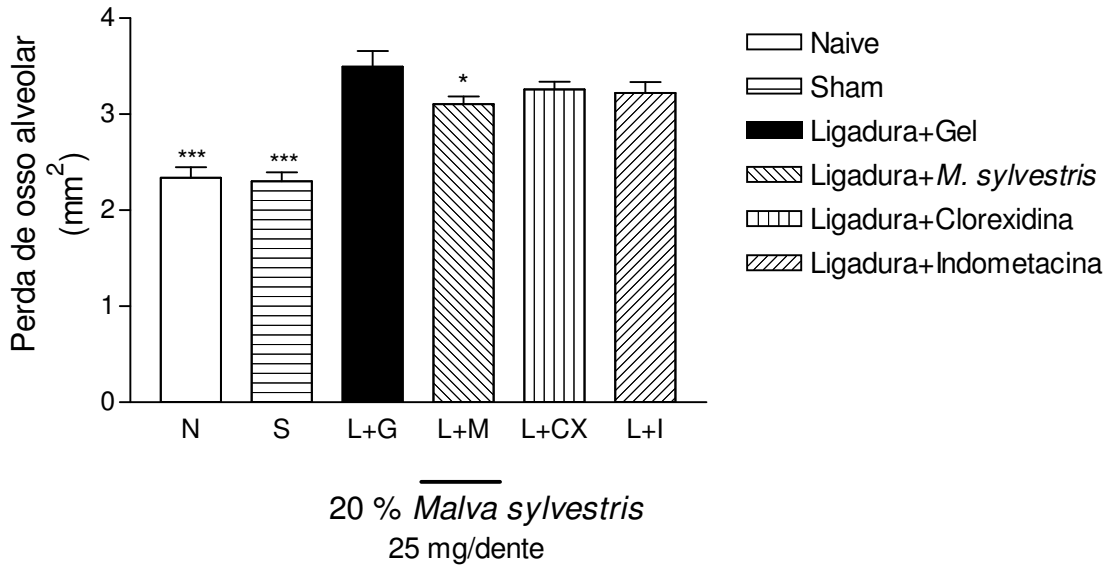


Fig 15. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) na reabsorção óssea periodontal em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 30 dias de indução e tratamento. *p<0,05, ***p<0,001 representam significância em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

5.4. Análise do Percentual de Suporte Ósseo (PSO)

As pranchas 8, 9 e 10 mostram as radiografias das mandíbulas com a reabsorção óssea interproximal, a partir das quais foi feita a análise do percentual de suporte ósseo remanescente, respectivamente dos animais tratados por 7, 15 e 30 dias.

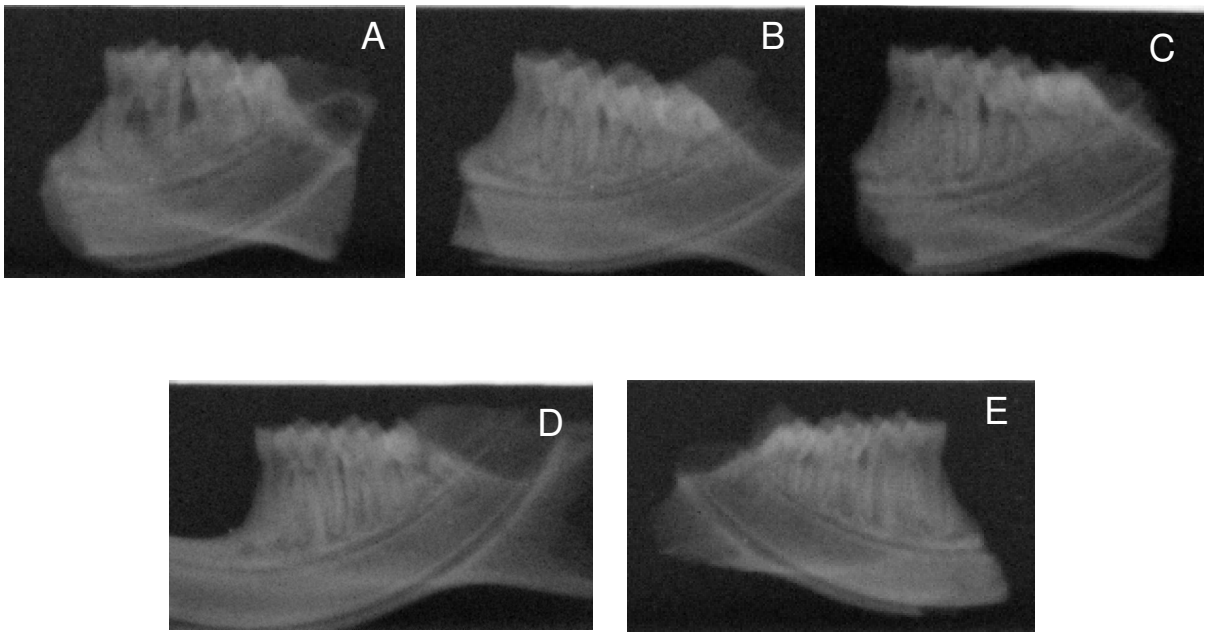
A figura 16 mostra a reprodutibilidade intra-examinador, através do gráfico de Bland-Altman, de dados obtidos na análise radiográfica do percentual de suporte ósseo em dois diferentes momentos, da mesma amostra (intervalo de 48 horas entre as medidas). A maioria das medidas está dentro dos limites de concordância.

A figura 17 representa o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo em amostra onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 7 dias de indução e tratamento. .

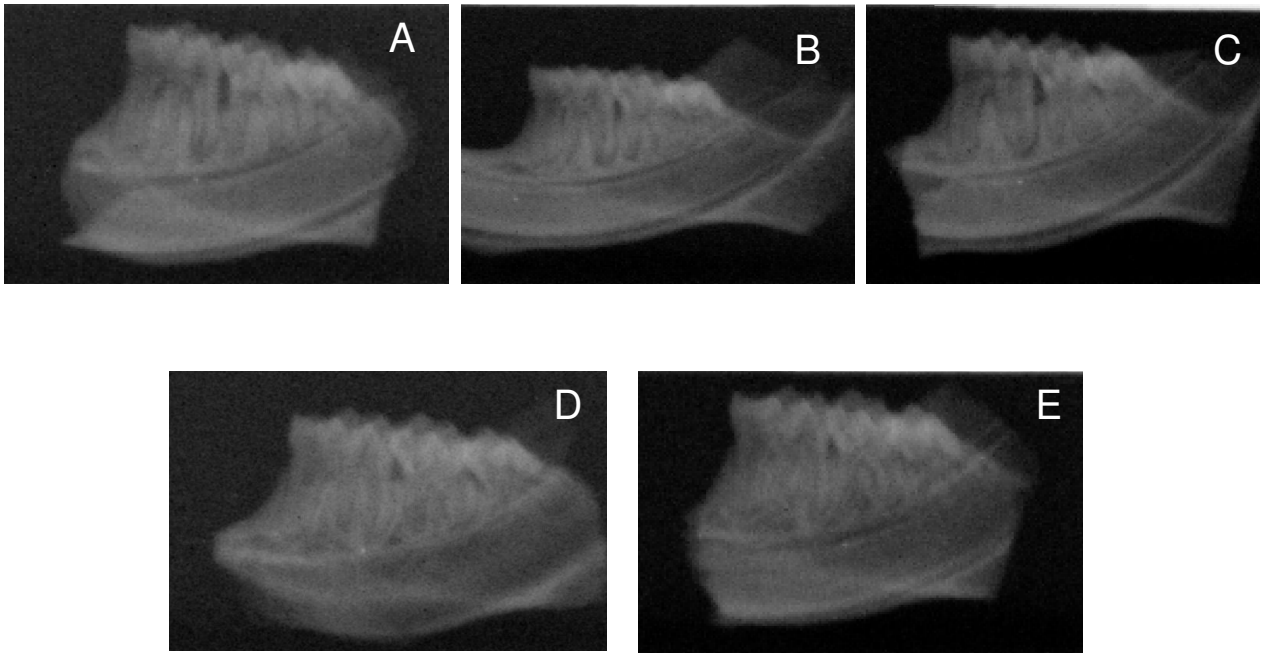
A figura 18 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo em amostra onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 15 dias de indução e tratamento. Houve diferença estatística entre os grupos Naive e Sham ($p<0,001$ e $p<0,05$ respectivamente) e o grupo Ligadura+Gel. Entre os demais grupos e o grupo Ligadura+Gel não houve diferença estatística, apesar de o grupo Ligadura+*M. sylvestris* apresentar percentual de suporte ósseo alto, o resultado não foi significante.

A figura 19 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo em amostra onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 30 dias de indução e tratamento. Verificamos que houve diferença estatística entre o grupo Ligadura+Gel e os grupos Ligadura+*M. sylvestris* ($p<0,001$), Ligadura+Clorexidina ($p<0,05$), Ligadura+Indometacina ($p<0,01$), Naive e Sham ($p<0,001$).

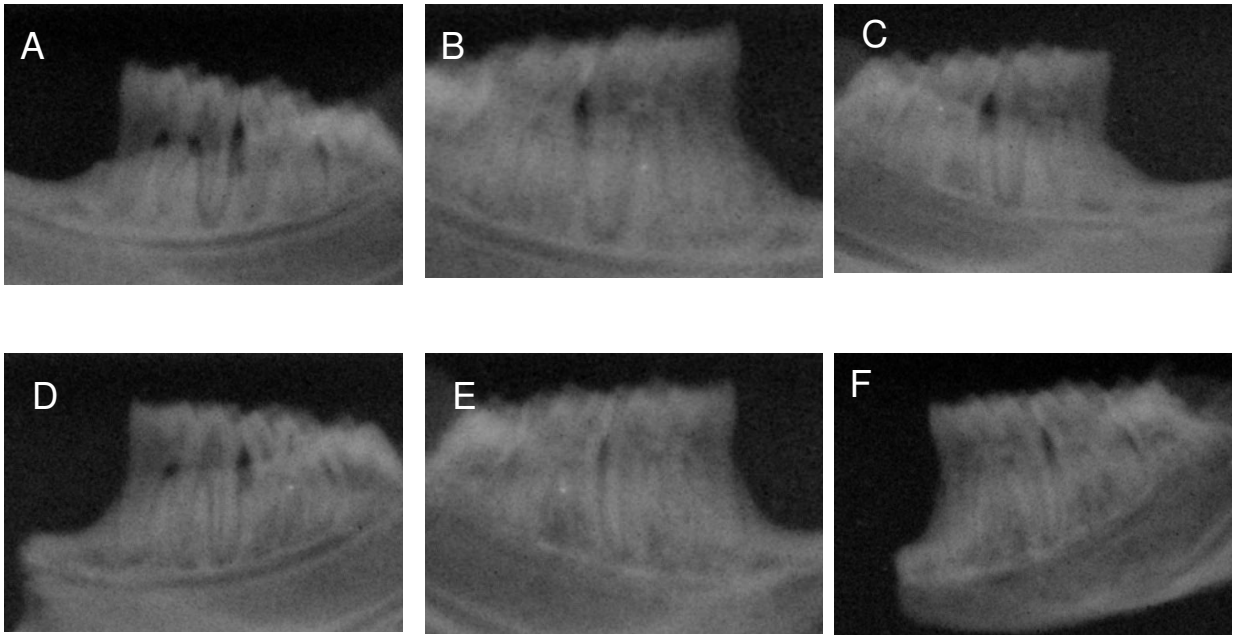
Prancha5



Prancha 8. - Radiografias a partir de onde foram feitas as análises do remanescente ósseo periodontal, de animais submetidos à ligadura e tratados por 07 dias. A – Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris.* C – Ligadura+Clorexidina. D – Sham. E – Naivel.



Prancha 9 - Radiografias a partir de onde foram realizadas análises do remanescente ósseo periodontal, de animais submetidos à ligadura e tratados por 15 dias. A – Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris.* C – Ligadura+Clorexidina. D – Sham. E – Naive.



Prancha 10 - Radiografias a partir de onde foram realizadas análises do remanescente ósseo periodontal, de animais submetidos à ligadura e tratados por 30 dias. A – Ligadura+Gel. B – Ligadura+*M. sylvestris*. C – Ligadura+Clorexidina. D – Ligadura+Indometacina. E – Sham. F – Naive.

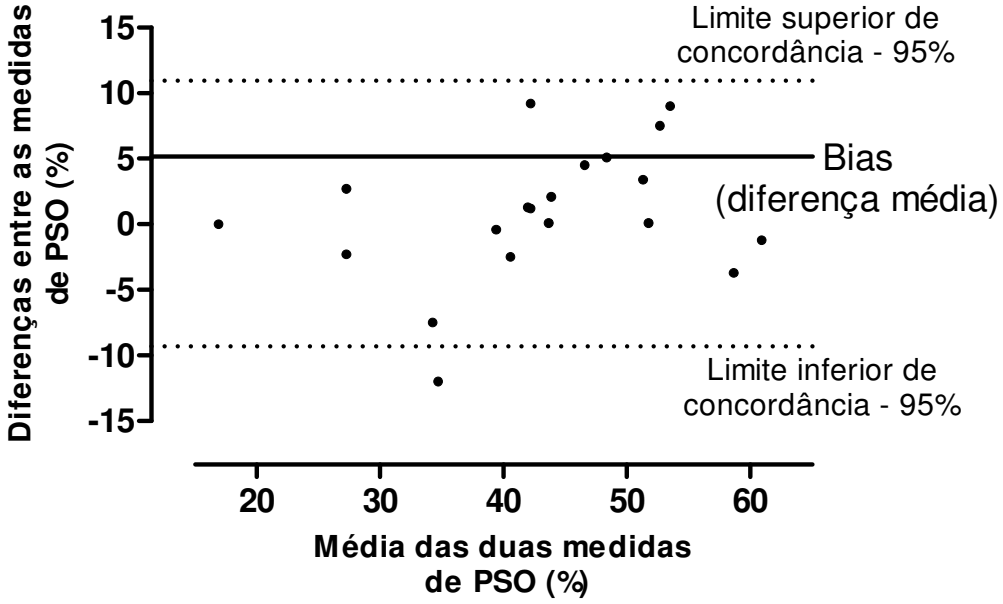


Fig.16. Reprodutibilidade intra-examinador. Gráfico de Bland-Altman dos dados obtidos com medidas do percentual de suporte ósseo (PSO %) em dois diferentes momentos. Maioria das medidas dentro dos limite de concordância.

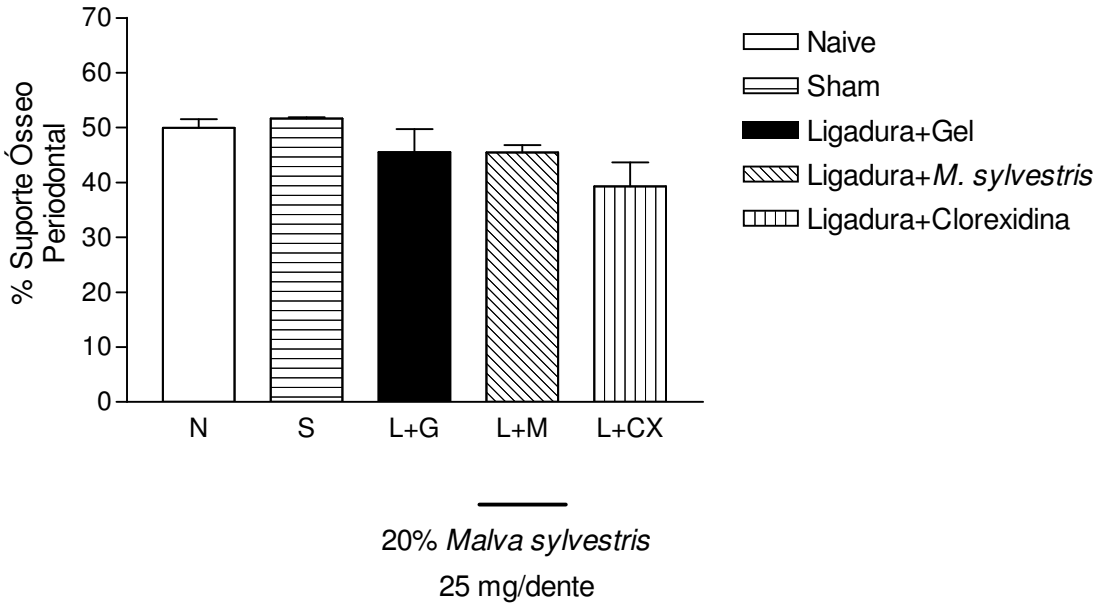


Fig 17. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo, em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 07 dias de indução e tratamento. Os dados representam a média ± EPM.

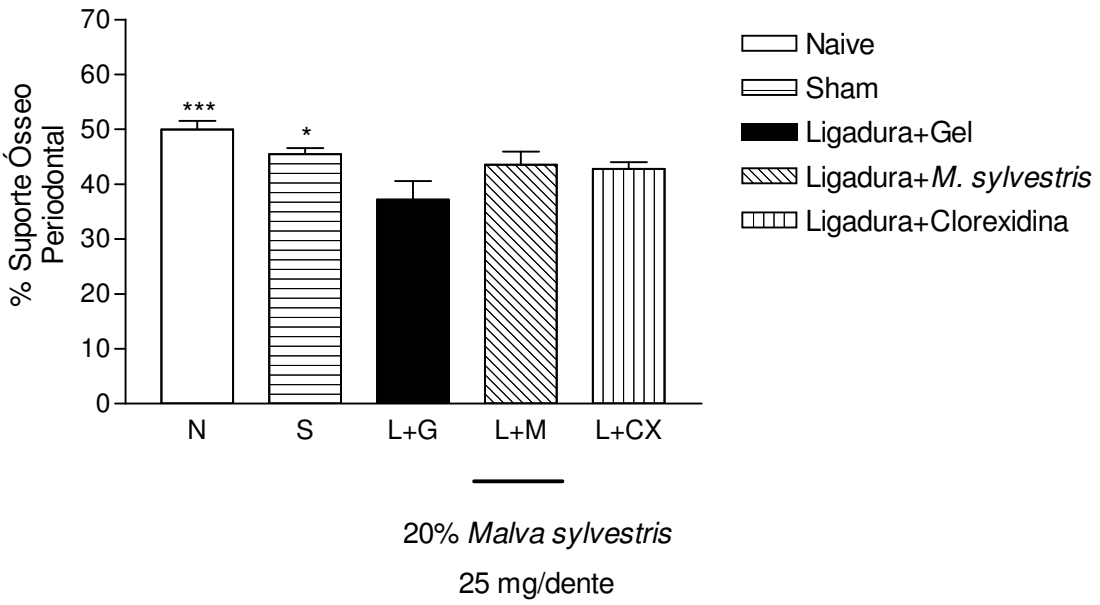


Fig 18. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo, em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 15 dias de indução e tratamento. *p<0,05 e ***p<0,001 considerados significantes em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

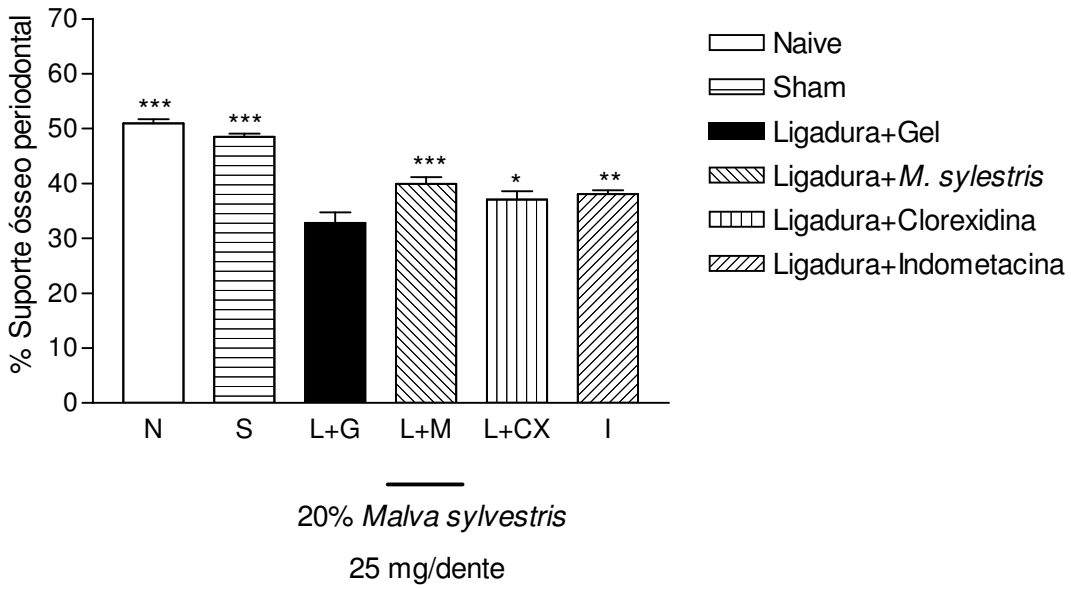


Fig 19. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 25 mg) no percentual de suporte ósseo, em tecido onde foi induzida a doença periodontal com ligadura, análise feita após 30 dias de indução e tratamento. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 considerados significantes em relação ao grupo Ligadura+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

5.5. Quantificação in vitro *de NO*

A figura 20 mostra o efeito da incubação, por 24 horas, de fibroblastos gengivais com LPS. O LPS estimula a liberação do nitrito das células, substrato do NO, sendo maior liberação encontrada com a concentração de 1 µg/mL. A liberação foi significante ($p<0,01$) em comparação ao grupo controle, que não recebeu estímulo.

Na figura 21 estão representados o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na liberação de NO em fibroblastos gengivais, análise feita após 24 horas de incubação do extrato com o LPS na concentração de 1 µg/mL (concentração que apresentou maior liberação de NO). Houve diferença estatística significante nas concentrações do extrato de 1,0 e 10 µg/mL ($p<0,01$) em relação ao grupo controle, onde não foi colocado o LPS e nem extrato. Isso mostra que em concentração igual ou superior a 1 µg/mL o extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* inibe a liberação de NO por fibroblastos estimulados por LPS.

A figura 22 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na viabilidade celular de fibroblastos gengivais, análise feita após 24 horas de incubação do extrato com o do LPS na concentração de 1 µg/mL, através do MTT. Nem o extrato ou o LPS alterou a viabilidade celular em 24 horas.

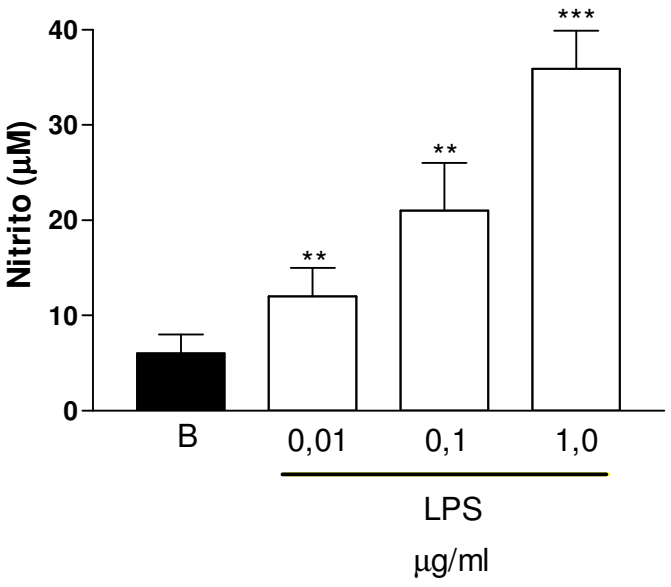


Fig 20. Efeito do LPS em diferentes concentrações, 0,01, 0,1 e 1 µg/mL na liberação de nitrito em fibroblastos gengivais, análise feita após 24 horas de incubação, **p<0,01, ***p<0,001 considerados significantes em relação ao grupo branco, onde não foi colocado o LPS. Os dados representam a média ± EPM.

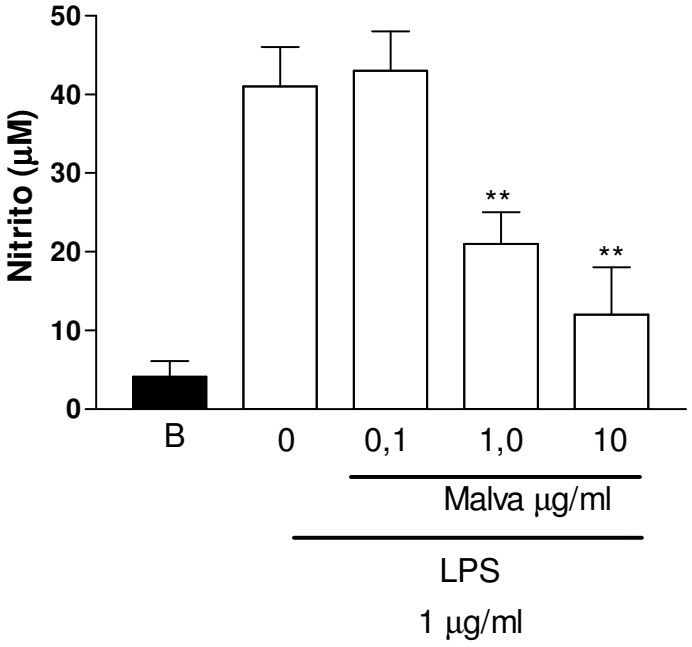


Fig 21. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na liberação de NO em fibroblastos gengivais, análise feita após 24 horas de incubação do extrato e do LPS na concentração de 1. µg/mL. **p<0,01 considerado significante em relação ao grupo branco, onde não foi colocado o LPS. Os dados representam a média ± EPM.

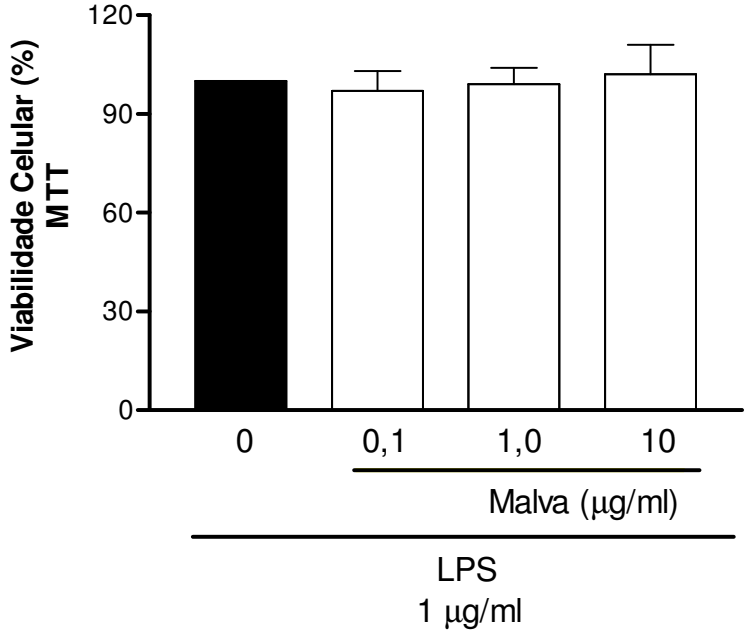


Fig 22. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL na viabilidade celular de fibroblastos gengivais, análise feita após 24 horas de incubação do extrato e do LPS na concentração de 1. µg/mL. Os dados representam a média ± EPM.

5.6. Cicatrização do Palato

5.7. Cicatrização em Relação ao Tempo

A figura 23 representa o processo de cicatrização de região de palato em relação ao tempo. O grupo tratado com *M. sylvestris* apresentou melhora na cicatrização, com diferença estatística significante em relação ao o grupo Lesão+Gel em 48, 144 e 192 horas ($p<0,001$, $p<0,05$ e $p<0,05$ respectivamente) O grupo tratado com Clorexidina não apresentou diferença estatística significante ao ser comparado com Lesão+Gel. O grupo Lesão apresentou retardo na cicatrização, com diferença estatística significante com o grupo Lesão+Gel no tempo de 144 e 192 horas ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente).

.

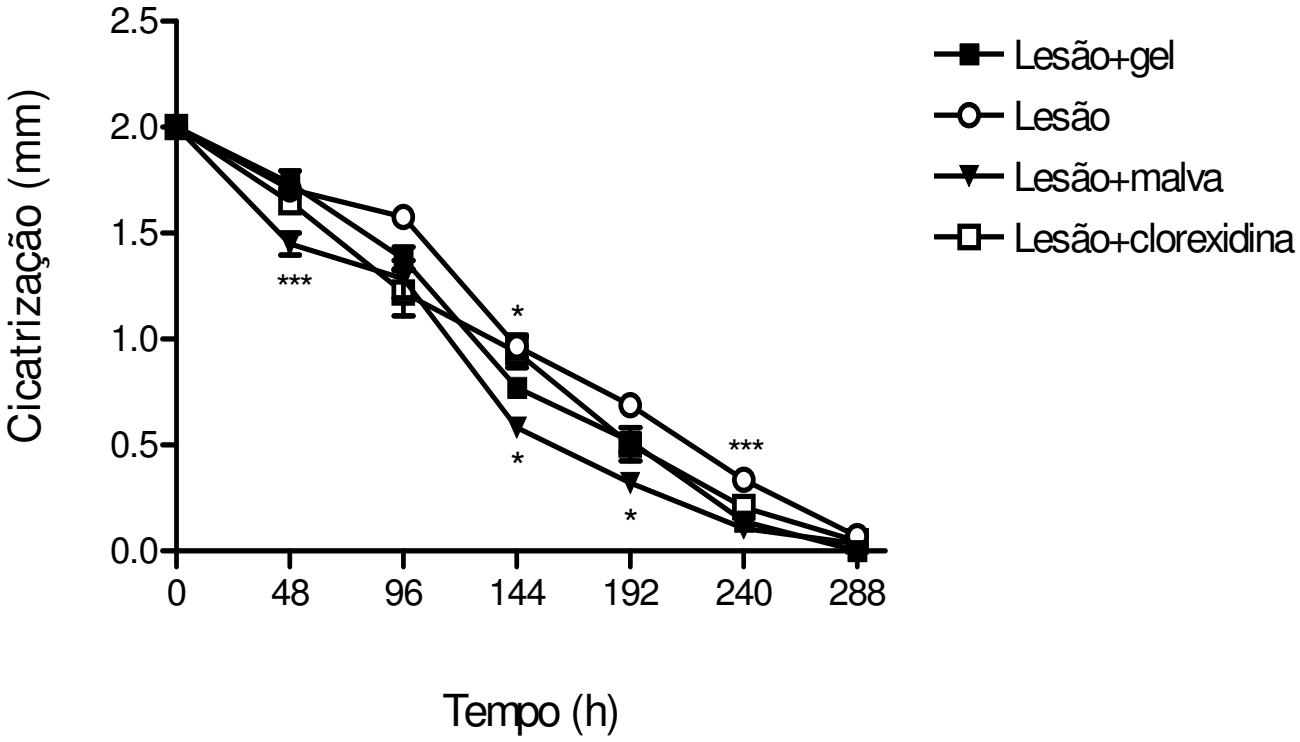
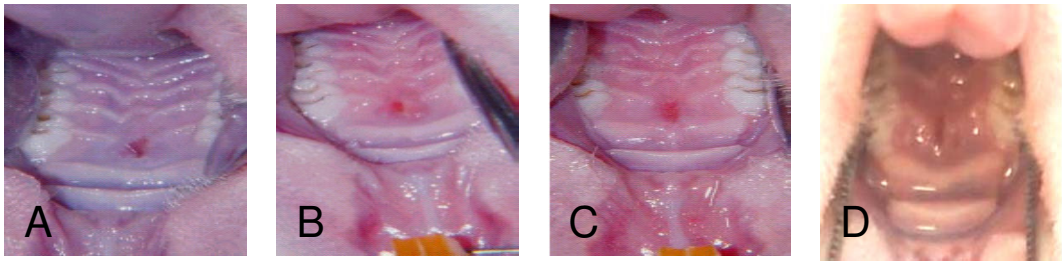


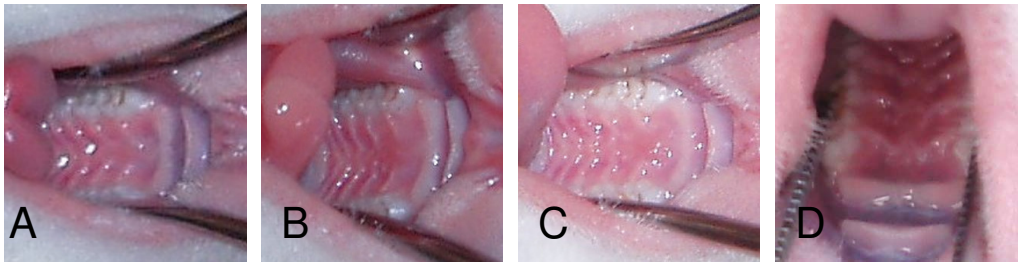
Fig. 23. Cicatrização do palato após indução da lesão. Os animais (n=8) foram divididos nos seguintes grupos: Lesão+*Malva sylvestris*, Lesão+Gel, Lesão e Lesão+Clorexidina. Os dados representam a média ± EPM da cicatrização da ferida (mm) por período de tempo (h). O grupo tratado com *Malva sylvestris* apresentou em relação ao grupo Lesão+Gel significância estatística de ***p<0,001 no segundo dia,. *p<0,05 no sexto e oitavo dia. O grupo que sofreu lesão e não foi tratado apresentou significância estatística de *p<0,05 no sexto dia e ***p<0,001 no décimo dia, em relação ao grupo Lesão+Gel.

5.8. Aspecto Clínico da Cicatrização

As pranchas 11 e 12 apresentam o aspecto clínico da região de lesão de palato dos grupos tratados em 7 e 15 dias



Prancha 11. Aspecto clínico do palato dos animais tratados por 7 dias. A – Lesão+Gel. B – Lesão+*M. sylvestris*. C – Lesão. D – Lesão+Clorexidina.



Prancha 12. Aspecto clínico do palato dos animais tratados por 15 dias. A – Lesão+Gel. B – Lesão+*M. sylvestris.* C – Lesão. D – Lesão+Clorexidina.

5.9. Análise Enzimática – MPO - na cicatrização

A figura 24 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima MPO. Análise realizada após 7 dias da execução da lesão e tratamento. O grupo Lesão+*M. sylvestris* e grupo Lesão+Clorexidina apresentaram diminuição da atividade de MPO, com significância estatística de $p<0,05$ em relação ao grupo Lesão+Gel. O grupo Naive apresentou diferença estatística significante em relação ao grupo Lesão+Gel de $p<0,01$. Não houve diferença estatística entre grupo Lesão e Lesão+Gel.

A figura 25 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na MPO, análise realizada após 15 dias da execução da lesão e tratamento. Neste resultado houve uma diminuição da atividade da MPO nos grupos Lesão+Gel e grupo Lesão+*M. sylvestris* mas não de forma significante entre os grupos. O grupo Lesão+Clorexidina não apresentou diminuição na atividade da enzima, tendo como significância estatística de $p<0,001$ em relação ao grupo Lesão+Gel. O grupo Lesão apresentou diferença significante em relação ao grupo Lesão+Gel de $p<0,05$.

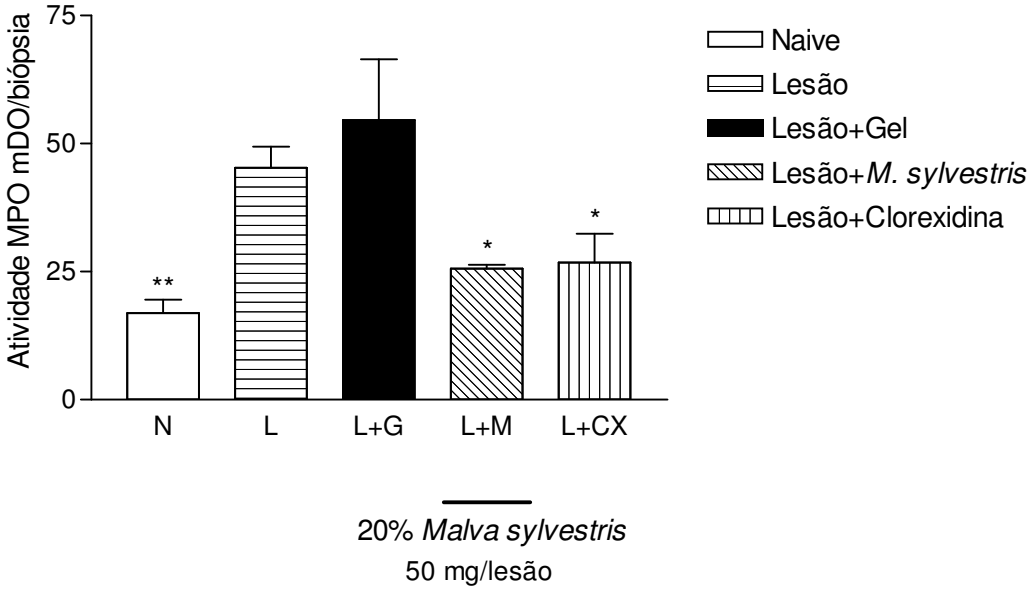


Fig 24. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima mieloperoxidase, análise realizada após 07 dias da lesão e tratamento. *p<0,05, **p<0,01 representam significância estatística em relação ao grupo Lesão+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

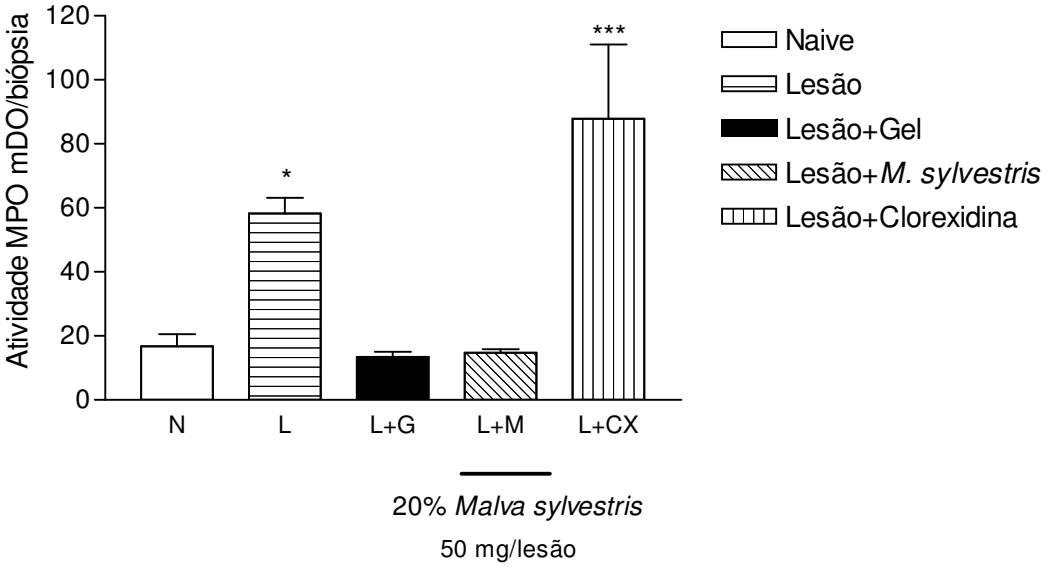


Fig 25. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima mieloperoxidase, análise realizada após 15 dias da lesão e tratamento. *p<0,05, ***p<0,001 representam significância estatística em relação ao grupo Lesão+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

5.10. Análise Enzimática – NAG - na cicatrização

A figura 26 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima NAG, realizada após 7 dias da lesão e tratamento.

A figura 27 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima NAG, análise realizada após 15 dias da lesão e tratamento.

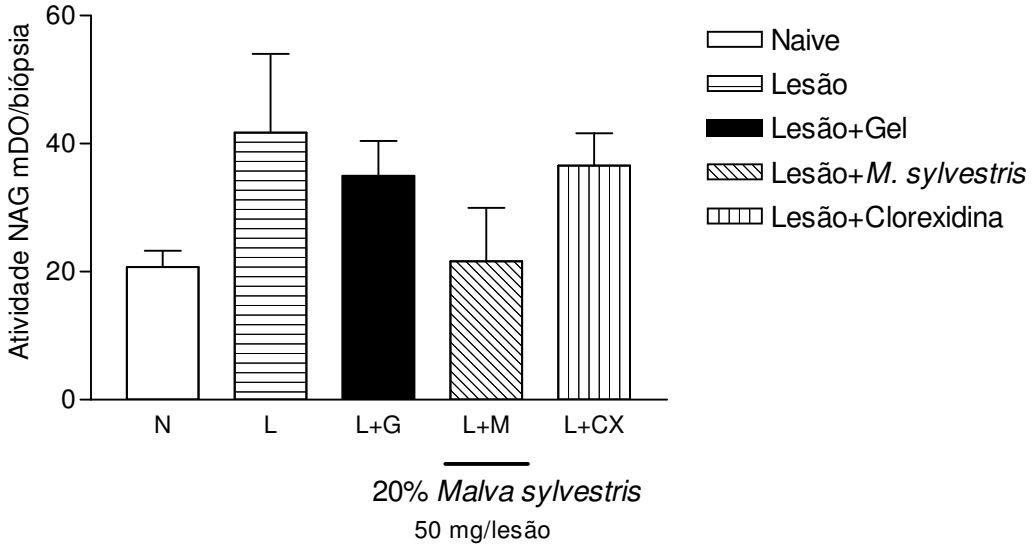


Fig 26. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na atividade da enzima NAG (N-acetil-β-D-glucosaminase), análise realizada após 7 dias da lesão e tratamento. Os dados representam a média ± EPM.

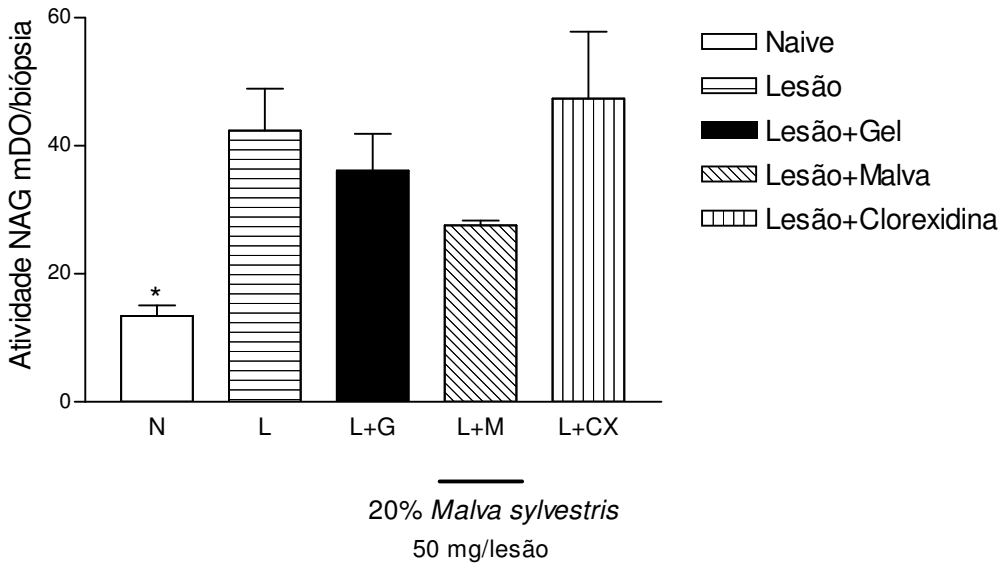


Fig 27. Efeito do extrato hidroalcoólico da *Malva sylvestris* (20% extrato em 50 mg) na NAG (N-acetil-β-D-glucosaminase), análise realizada após 15 dias da lesão e tratamento. $^{*}p<0,05$ considerado significativo em comparação ao grupo Lesão+Gel. Os dados representam a média ± EPM.

6. DISCUSSÃO

Modelos animais são importantes fontes de informações sobre periodontopatias em resposta a bactérias (EKUNI *et al*., 2003). Sendo assim, o mais importante no momento de escolha de modelos laboratoriais para estudar a doença periodontal, é a escolha de modelos que apresentem características anatômicas similares aos humanos e à doença periodontal. A destruição inflamatória do periodonto pode ser experimentalmente induzida em muitas espécies de mamíferos (WEINBERG *et al*., 1999).

Neste trabalho foi utilizado o protocolo de indução de doença periodontal em ratos, através de uma ligadura, o qual já foi bem estabelecido em outros estudos (NASSAR *et al.,* 2000; HOLZHAUSEN *et al*., 2002). A ligadura foi utilizada como irritante gengival, para que houvesse um acúmulo de biofilme dental, tendo como conseqüência o desenvolvimento da doença periodontal. A preferência pela técnica utilizada, preconizada por JOHNSON (1975) e SALLUM (1982) ocorreu pela maior confiabilidade no método (NASSAR *et al*., 2003).

A partir de estudos, como os realizados por JOHNSON (1975) e KOIDE *et al*. (1995), foi observada a presença de infiltrado inflamatório, perda de inserção e destruição óssea alveolar em ratos com periodontite induzida por esse método e, desta maneira, foi estabelecido que o processo inflamatório induzido pela ligadura necessita da presença de agentes microbianos locais (GALVÃO *et al*., 2003). No entanto, é sabido que nem todos os acúmulos de biofilme dental levam ao desenvolvimento da doença periodontal. Existem outros fatores que predispõem, ou não, ao desenvolvimento da doença, como diferenças genéticas inatas, tabaco, hormônios, diabetes, drogas, doenças sistêmicas com manifestações bucais e fatores ambientais (KINANE *et al*., 2007). Embora as bactérias sejam consideradas como agentes primários na etiologia (XIMENEZ-FYVIE *et al*., 2000), a patogênese da doença periodontal envolve a interação hospedeiro predisposto e bactéria, seguida de uma reação inflamatória local, havendo liberação de mediadores inflamatórios como eicosanóides e citocinas (PAGE *et al*., 2002).

A inflamação apresenta uma série de respostas geradas pelo hospedeiro a vários agentes agressores. Os efeitos iniciais da inflamação são derivados de

reações vasculares no local afetado, levando a exsudação de fluido e proteínas do plasma e recrutamento de leucócitos para o local. A inflamação serve como primeiro passo na resposta imune, através da qual a infecção é eliminada e a lesão reparada (KUMAR *et al.*, 2005). No caso de inflamação crônica, a persistência da resposta leva a destruição tecidual e pode resultar em alterações patológicas irreversíveis (SERHAN *et al.*, 2001).

Vários mediadores químicos têm papel no início do processo inflamatório. Proteínas como as citocinas, lipídios com baixo peso molecular derivados do AA, gases como NO e monóxido de carbono, espécies reativas de oxigênio e nucleotídeos são reconhecidos como mediadores (SERHAN *et al.*, 2001). Metabólitos do AA, principalmente prostaglandinas da série E (PGE_2), parecem ser mediadores críticos na progressão da doença periodontal. Existem várias evidências sugerindo a associação de níveis elevados de PGE_2 no fluido gengival com manifestação clínica de doença periodontal e reabsorção óssea (PAQUETTE *et al.*, 2000).

Outra metodologia, que pode ser realizada em animais e ter seus resultados extrapolados ao seres humanos, é a utilizada para se obter maior conhecimento dos efeitos de reparos cirúrgicos em lábios, alvéolos e palato (LEENSTRA *et al.*, 1998). Esse modelo também foi de interesse ao nosso trabalho, pois o resultado normal final de uma inflamação é a cura com ou sem cicatriz. A cicatrização é um fenômeno complexo que envolve vários estágios, incluindo inflamação, proliferação e remodelação tecidual. Ratos podem ser considerados modelos adequados para estudar esse processo, principalmente se houver interesse no estudo da interação entre células, citocinas e matriz extracelular (CORNELISSEN *et al.*, 1999). O protocolo realizado neste trabalho para promover a lesão e analisar a cicatrização tecidual foi adaptado de CORNELISSEN (1999), ODA *et al.* (2004) e KOZLOWSKY *et al.* (2007).

Ao considerarmos as alterações inflamatórias periodontais e demais lesões que ocorrem no meio bucal, que também necessitam de cicatrização, é de grande importância encontrar um tratamento com resultado satisfatório e pouco, ou nenhum, efeito colateral. Alterações que envolvem a mucosa mastigatória e de revestimento possuem, além da dor, que debilita o paciente, o desconforto na alimentação, fonação e dificuldade para higiene adequada do meio bucal. Aliado as alterações

bucais há o fato de que, o meio bucal não pode ser isolado para que a resolução das alterações inflamatórias ocorra sem os traumas provocados por ações diárias (alimentação, escovação).

A partir do uso popular e empírico da *M. sylvestris*, no meio bucal, é que objetivamos investigar de forma científica seu uso. A *M. sylvestris* é conhecida por suas ações antiinflamatórias, pela presença de flavonóides, grupo fenólico importante e diversificado entre os produtos naturais que age, além de outras atividades, como antiinflamatório e antioxidante (SIMÕES *et al.,* 2004; FARINA *et al*., 1995; KIM *et al*., 2004). Nas folhas da *M. sylvestris* há a presença de polissacarídeos, antocianinas e terpenos o que contribui para a atividade antiinflamatória (BUFFON *et al*., 2001; CUTILLO *et al*., 2005). Já a presença de tanino confere a esta planta a possibilidade de ser utilizada como agente cicatrizante. Plantas que possuem tanino são empregadas no tratamento de hemorragias, feridas, queimaduras, úlceras gástricas e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Neste trabalho foi mostrado que a indução da doença periodontal com a ligadura apresentou, clinicamente, acúmulo de biofilme dental na região dos molares, sendo esse acúmulo não avaliado quantitativamente ou qualitativamente.

Tecidos epiteliais bucais saudáveis ao serem estimulados por bactérias reagem a essa alteração mobilizando seus próprios mecanismos antimicrobianos e permitindo que células do sistema imune inato e adaptativo tenham acesso aos patógenos. Histologicamente, tecidos saudáveis possuem não somente células epiteliais, mas também células dendríticas, leucócitos polimorfonucleares e outros leucócitos como linfócitos e fagócitos mononucleares (SCHENKEIN, 2006).

Em modelos experimentais de inflamação, é bem documentado que os polimorfonucleares precedem as células mononucleares no local afetado pelo estímulo bacteriano (KANTARCI *et al*., 2005). Em locais de inflamação crônica, bactérias participam na atração de leucócitos para o tecido periodontal pela expressão de peptídeos quimioatrativos ou pelo estímulo da produção de secreção de citocinas quimiotrativas, o que leva a um acúmulo de leucócitos no tecido do hospedeiro (SCHENKEIN, 2006). Autores como GUSTAFSSON *et al*., 2006, relacionam a destruição tecidual e perda de tecidos de suporte na doença periodontal com a liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio

(ROS), por neutrófilos ativados. E mostram que a inflamação pode depender de fatores constitucionais modulados por citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). Leucócitos mononucleares como monócitos e linfócitos, são as maiores fontes dessas citocinas. Monócitos, estimulados por LPS bacteriano também liberam mediadores inflamatórios como prostaglandina E_2, tromboxano B e interleucinas -1,6 e 8. Há níveis de mediadores monocíticos no fluido gengival agindo como marcadores da atividade da doença periodontal no local afetado (CHAMPAGNE *et al.,* 2003). Estudos em modelos experimentais têm indicado que a inibição ou interrupção dessas vias resulta na inibição da destruição tecidual periodontal mediada por bactérias (ASSUMA *et al*., 1998; GRAVES *et al*., 1998; DELIMA *et al*., 2002).

Alguns autores, entre eles HOLZHAUSEN (2005), utilizaram a medição da atividade da MPO como parâmetro inflamatório da migração de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos periodontais. Neste trabalho, verificou-se que o pico da atividade da MPO ocorreu em 7 dias após a colocação da ligadura. Esse fato pode ser explicado devido aos neutrófilos constituírem as células representativas da primeira linha de defesa do organismo frente a estímulos inflamatórios (KANTARCI *et al*., 2005). Após períodos iniciais de inflamação e conseqüente migração de outras células de defesa, como monócitos e macrófagos, a quantidade de neutrófilos no local afetado tende a diminuir (GOMES, 2006). Em 15 e 30 dias os níveis de MPO foram menores que em 7 dias, resultado que vai de encontro com GOMES (2006). Essa diminuição pode ser explicada pela crescente migração de monócitos e macrófagos que acabam fagocitando neutrófilos, impedindo sua degranulação excessiva (SCHENENKEIN, 2006). O grupo tratado com *M. sylvestris* mostrou uma redução significante nos níveis de MPO nos 30 dias de tratamento, em comparação ao grupo onde foi realizado a ligadura e tratado somente com gel de natrosol. Fato que pode ser explicado pela redução, prevista, dos níveis de neutrófilos e conseqüente redução da enzima MPO ou, por uma possível ação do extrato hidroalcóolico sobre a migração de polimorfonucleares, sendo necessário um período maior de tratamento para que ocorra essa diminuiçãode forma significativa.

Neste trabalho foi também verificado se a *M. sylvestris* possui ação sobre mononucleares, da mesma forma com que foi investigado em relação aos polimorfonucleares, utilizando a avaliação da atividade da enzima NAG, a qual é um

indicativo da presença de monócitos/macrófagos (RAO *et al.*, 1993). Os resultados mostram que, tanto em 15 quanto em 30 dias, o grupo tratado com *M. sylvestris* apresentou uma redução nos níveis de ati de forma significativa. Sugerindo que, quando há a presença efetiva de mononucleares, o que não ocorre em períodos imediatos à lesão, a planta incorporada ao gel de natrosol, reduz a infiltração desses agentes.

Os níveis de redução da MPO e NAG pelo extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris,* em 30 dias, foram comparáveis ao da clorexidina, conhecido agente antimicrobiano, efetivo nos tratamentos de doenças periodontais. O mecanismo de ação da clorexidina está relacionado com a redução da formação da película adquirida, alteração da aderência bacteriana ao dente e alterações nas paredes celulares das bactérias. Em 30 dias as reduções enzimáticas foram também comparáveis a indometacina, droga antiinflamatória não-esteroidal que reduz a destruição inflamatória atuando sobre os metabólitos do AA (ÇETIN *et al.*, 2004; AZOUBEL *et al.*, 2007). Nesse mesmo período de tempo, os níveis de redução da MPO e NAG pelo extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris,* foram comparáveis aos níveis basais como o grupo Naive e Sham, podendo-se sugerir que a *M. sylvestris* possui ação antiinflamatória quando aplicada topicamente por tempo superior a 15 dias, sendo ainda necessário esclarecer por qual mecanismo de ação isso acontece.

Outro fato, que deve ser levado em conta na hora da escolha do tratamento da doença periodontal e que, durante a evolução da doença está presente, é a rebsorção ou desmineralização óssea. As prostaglandinas (PGs) estão incluídas como agentes de promoção de reabsorção óssea, principalmente as da série E, sendo esse efeito bloqueado pela indometacina, um antiinflamatório não esteroidal não-seletivo. Quando estão presentes alterações patológicas a isoenzima da ciclooxigenase (COX) COX 2 induz a síntese de grandes quantidades de prostaglandinas, que estão ligadas ao dano local (BEZERRA *et al.*, 2002). A ciclooxigenase (COX) é a primeira enzima envolvida no metabolismo do AA. Três isoformas são conhecidas, a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1, sob condições fisiológicas, é responsável pela produção de PGs constitutivas em vários tecidos, PGs produzidas por COX-1 são tecido protetoras. Por outro lado, a expressão de COX-2 é induzida por citocinas e fatores de crescimento e, grande quantidade de PGs são produzidas por COX-2 em áreas de lesão inflamadas (KUJIBU, *et al.*,

1992). A produção de PGs constitutiva, a qual depende da COX-1, pode ter um importante papel na regulação de funções fisiológicas no epitélio juncional e osso alveolar (MIYAUCHI, *et al*., 2004). Estudos têm demonstrado que PGE_2 pode mediar a reabsorção óssea patológica na periodontite e está associada também com a perda de inserção (MIYAUCHI *et al*., 1992). Esses estudos demonstram que PGs produzidas por COX-2 induzida estão envolvidas na patogênese da periodontite (LOHINAI *et al*., 2001). Neutrófilos e macrófagos presentes no tecido periodontal inflamado são conhecidos como responsáveis, em parte, pela liberação local de eicosanóides, principalmente de PGE_2 (Lindemann *et al*., 1988). A proteína COX-2 é expressa em células mononucleares inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos gengivais, células epiteliais de gengiva humana inflamada, e sua expressão é mais significativa em tecidos com altos níveis de infiltrado inflamatório (MORTON *et al.,* 2001). PGE_2 é bem conhecida por mediar reabsorção óssea osteoclástica e destruição de tecido conjuntivo via produção de colagenase (STERRETT, 1986), havendo a relação entre o aumento dos níveis de PGE_2 no fluido gengival e sua associação com perda de inserção periodontal (PRESHAW *et al.,* 2002).

Um dos métodos que foi utilizado, neste trabalho, para medir as perdas ósseas horizontais localizadas nas faces livres dos molares, a partir de imagens obtidas de mandíbulas descarnadas e coradas, foi o morfométrico (SOUZA *et al*., 2005). Devido a questões anatômicas foram medidos valores somente da área da região lingual. De acordo com avaliação dos nossos resultados, através do exame morfométrico, a *M. sylvestris* apresentou uma diminuição na reabsorção óssea quando aplicada por um período mínimo de 15 dias. Como não houve a investigação, neste trabalho, sobre a ação da planta em citocinas ou prostaglandinas, pode-se sugerir que, como a *M. sylvestris* reduziu de forma significativa a presença de polimorfonucleares e mononucleares, no mesmo período de tempo, ela também tenha agido de forma indireta sobre a produção de prostaglandinas, entrando em concordância com EL ATTAR *et al*.(1986) e GOMES, (2006). Os autores relatam que, neutrófilos e macrófagos presentes no tecido periodontal inflamado, são tidos como responsáveis, pelo menos em parte, pela liberação local de citocinas e prostaglandinas, principalmente PGE_2 e promovem a liberação de osteoclastos, justificando a reabsorção óssea ocorrida e sua inibição nos grupos tratados com *M. sylvestris.*

Experimento realizado com o extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris*, aplicado topicamente, na dose de 3 mg, utilizado como tratamento após a indução de edema de orelha em camundongos pelo agente flogístico éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), mostrou uma inibição no edema de orelha pelo extrato hidroalcoólico de 77±6% comparado com 89±2% da dexametasona, antiinflamatório esteroidal e droga de referência. Utilizando esse mesmo agente flogístico, houve uma redução na atividade da MPO de 73±1% comparado a 74±1% da dexametasona. Quando o agente flogístico foi o AA a inibição do edema foi de 80±3% no grupo tratado com o extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris* comparado a 62±6% do grupo tratado com indometacina (resultados não mostrados). Sugerindo novamente, nesse outro protocolo de indução de inflamação, que a *M. sylvestris* tem ação antiinflamatória tópica, podendo ser comparada com antiinflamatórios com mecanismo de ação conhecidos.

Estudos relatam que a indometacina reduz a reabsorção óssea alveolar, fato que só observamos, neste trabalho, no tratamento por período de 30 dias, possivelmente por uma dificuldade de absorção pela via tópica, já que a maioria dos trabalhos que utiliza o mesmo modelo de indução de doença periodontal faz a aplicação de indometacina por via subcutânea ou oral. Nós optamos por usar a via tópica para igualar a forma de tratamento que já estava sendo realizada nos outros grupos.

O desenvolvimento da periodontite experimental foi novamente confirmado pela presença de perda óssea periodontal proximal, visto radiograficamente nos grupos onde foi feita a ligadura, indo de encontro aos resultados encontrados por NASSAR *et al.*(2003) e NASSAR *et al.* (2004). Apesar de que, um estudo feito com ratos de 5 semanas de vida por KLAUSEN (1991) mostrou que, com a idade, os molares desses animais sofrem uma erupção passiva e contínua remodelação óssea, apresentando um aumento fisiológico da distância entre a junção esmalte-cemento e a crista óssea alveolar. Esse fato pode justificar a presença de perda óssea observada pelo exame morfométrico no grupo Naive em 30 dias. O método radiográfico possibilita quantificar as perdas ósseas proximais, determinando o percentual de suporte ósseo remanescente a partir de defeitos intra-ósseos (SOUZA *et al.*,2005). No presente estudo, através da análise radiográfica das mandíbulas, onde foi induzida a ligadura, foi verificado que em 7, 15 e 30 dias, o suporte ósseo

periodontal foi reduzido no grupo Ligadura+Gel. Tendo o grupo tratado com *M. sylvestris* apresentado maior remanescente ósseo e diferença estatística significante ao ser comparado ao grupo Ligadura+Gel. Sugerindo que a *M. sylvestris* pode inibir a perda óssea proximal, da mesma forma que a de face livre, e isso pode ser explicado pelo conjunto de resultados encontrados na inibição de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares.

De acordo com resultados apresentados foi verificado que o extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris,* nas concentrações de 1,0 e 10 µg/mL, inibiu *in vitro* a liberação de NO, de forma indireta, através da inibição de nitrito, por fibroblastos estimulados com LPS bacteriano, isto sem alterar a viabilidade celular tanto pelo LPS quanto pelo extrato, como demonstrado. O nitrato e nitrito, em soluções aquosas, podem ser utilizados como índices para a quantificação de NO *in vitro*, pois o NO tem uma vida curta (MONCADA e HIGGINS, 1993). Fibroblastos estimulados por LPS ou por citocinas liberam NO (SUSILOWATI *et al.,* 2002). O NO é um gás e um radical livre que reage com muitas moléculas. Ele é sintetizado a partir da L-arginina por uma família de isoenzimas chamadas NO sintases. Duas dessas enzimas são expressas constitutivamente e a terceira é induzida por estímulo imunológico. O NO liberado pela enzima NO sintase induzida (iNOS) é gerado por longos períodos pelas células do sistema imune entre outras. (REHER *et al.,* 2007). A iNOs pode ser ativada por uma variedade de estímulos como oxidantes, LPS, bactéria, vírus e citocinas pró-inflamatórias. Radicais livres e produtos de reações oxidativas produzem dano tecidual maior ainda em tecidos já machucados (NOHL, 1994). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio (O_2), radicais superóxido (O_2-) e radicais hidroxila (OH) são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), as espécies mais reativas derivadas do metabolismo do oxigênio em meio aeróbio. Células fagocitárias liberam grande quantidade de ROS (WANG *et al.,* 2006). O NO pode ser citotóxico de forma direta ou interagir com ânions superóxido resultando na formação de peróxidonitrito (ONOO-), o qual é a forma mais reativa de espécies reativas de nitrogênio (RNS). A produção em excesso de ROS, NO e RNS, podem causar danos ao DNA, lipídios, proteínas e carboidratos, levando a alterações celulares e aumentando estados inflamatórios. O stress oxidativo clássico é descrito como um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS e RNS e está envolvido em diversas patologias (WANG *et al.,* 2006). Neste estudo foi verificado

que o extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris* inibiu a liberação de NO em fibroblastos de gengiva estimulados por LPS, sugerindo que essa também pode ser uma das vias de ação da planta, possivelmente pela presença de antioxidantes em sua constituição.

Da mesma forma que ocorre a inflamação como resposta de defesa do organismo a um estímulo, a cicatrização é um processo necessário para a remoção de patógenos do tecido danificado e completa remodelação de uma ferida. Ela é constituída por três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (PANCHATCHARAM *et al.*, 2006), envolvendo também fibroplasia, neovascularização, contração da ferida (SKALLI *et al.*, 1988). Vários fatores afetam ao processo de cicatrização como idade e doenças sistêmicas. Na fase inflamatória, inicialmente, o colágeno exposto pela ferida ativa a cascata de coagulação. O coágulo presente é formado por colágeno, plaquetas, trombina, fibronectina e esses fatores liberam citocinas e fatores de crescimento (BROUGHTON II *et al.,* 2006). No coágulo de fibrina há a presença de neutrófilos, que chegam ao local da ferida em minutos, seguidos por monócitos e linfócitos, fibroblastos e células endoteliais. Eles produzem uma série de proteinases e espécies reativas de oxigênio como uma defesa contra microrganismos. As citocinas e fatores de crescimento liberados por essas células iniciam a fase proliferativa (WERNER *et al.,* 2003). Na fase seguinte, proliferativa, ocorre a epitelização, angiogênese, estimulada por TNF-α, migração endotelial e formação de capilares (BROUGHTON II *et al.*, 2006). A parte final da fase proliferativa é a formação do tecido de granulação. Fibroblastos sintetizam colágeno. Fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial (EGF) são os principais sinalizadores para os fibroblastos, e estes se transformam em miofibroblastos para promover a contração da ferida. Os miofibroblastos expressam proteínas do citoesqueleto de músculo liso (α-SMA), que estão envolvidas na produção de matriz extracelular (ECM) e contração da ferida (VAN BEURDEN *et al.,* 2006). Em resposta ao PDGF, fibroblastos sintetizam uma matriz celular composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanas, fibronectina e ácido hialurônico. Simultaneamente ocorre a reepitelização pela proliferação e migração de células epiteliais da borda da ferida para o centro. Na fase de remodelação a deposição de colágeno é organizada (CLARK, 1996).

A cicatrização de feridas, no meio bucal e na pele, difere em vários aspectos (VAN BEURDEN, 2005). Estudos relatam que a cicatrização no meio bucal é mais rápida e com cicatrizes menores (HAKKINEN *et al*., 2000). A causa disso não está completamente definida, mas a saliva, leucócitos, fatores de crescimento e subpopulação de fibroblastos podem estar envolvidos (LEPEKHIN *et al*., 2002). A saliva presente no meio bucal promove um meio ambiente favorável à cicatrização (HAKKINEN *et al.,* 2000). A presença de fatores de crescimento na saliva como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento vascular (VEGF), fatores de crescimento de fibroblastos podem aumentar o reparo da ferida (SKALERIC *et al*., 1997; FUJISAWA *et al*., 2003). Macrófagos, neutrófilos, células T, fatores pró-inflamatórios como IL-6 e TGF-β1, estão presentes em menor quantidade na cicatrização da mucosa bucal do que na pele (HAKKINEN *et al.,* 2000; SZPADERSKA *et al*., 2003). A melhora na cicatrização, de acordo com o tempo, mostrada pelo grupo tratado com *M. sylvestris* em relação demais grupos, pode ter sido proporcionada pela formação de uma barreira mecânica sobre a lesão, evitando contaminação bacteriana. Também pode ser resultante da ação antimicrobiana mostrada pela *M. sylvestris* em bactérias presentes no meio bucal como mostrado no trabalho de BUFFON *et al* (2001), pois bactérias prolongariam a fase inflamatória e interfeririam na epitelização, contração e deposição de colágeno (BROUGHTON II *et al*., 2006) e também, por ação antiinflamatória, já que ela mostrou melhor resultado no período inflamatório da cicatrização.. A diminuição da MPO, de forma significativa, pelo grupo tratado com a *M. sylvestris* em relação ao grupo lesão+gel, em 7 dias, reafirma uma possível ação antiinflamatória da *M. sylvestris*, neste caso contribuindo também para a cicatrização. Se o estímulo de neutrófilos recrutados para o local da lesão persiste, os remanescentes são fagocitados por macrófagos, os quais estão presentes no local após dois dias da lesão. Macrófagos têm um importante papel na cicatrização pela síntese de fatores de crescimento que irão promover a proliferação celular e a síntese de matriz (EMING *et al*., 2007). O grupo tratado com *M. sylvestris* também mostrou uma diminuição no indicativo da presença de polimorfonucleares (NAG), mas não de forma significativa, tanto em 7 quanto em 15 dias, em relação ao grupo lesão+gel. Sugerindo que a ação do extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris,* durante o processo de cicatrização, foi mais intensa

sobre polimorfonucleares, tendo ação antiinflamatória, mas permitindo de forma controlada a ação dos mononucleares.

Como citado anteriormente, produtos naturais contendo como princípios ativos terpenos, taninos, polissacarídeos e flavonóides, podem promover o processo de cicatrização (SHARMA, 1990), e esses estão presentes na *M. sylvestris.* As ações antiinflamatórias e cicatrizantes do extrato hidroalcóolico da *M. sylvestris* podem ser devido à presença dos componentes fitoquímicos tanino, que é considerado um bom inibidor enzimático; à mucilagem, que funciona como antiinflamatório, cicatrizante e protetor de mucosas; além de flavonóides, reconhecidos por possuir atividades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatórias, hepatoprotetoras, antitrombótica, antitumoral e antiviral e, óleos essenciais que atuam como analgésicos, cicatrizantes e antiinflamatórios (SANTOS *et al*., 1988; NIJEVELDT *et al*., 2001). Polissacarídeos, antocianinas e terpenos, presentes nas folhas da planta, também contribuem para a atividade antiinflamatória (CUTILLO *et al*., 2005). Plantas que possuem tanino são empregadas no tratamento de hemorragias, feridas, queimaduras, úlceras gástricas e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). De acordo com SHALE *et al*. (2005) extratos hexânicos, metanólicos e aquosos, da espécie *Malva parviflora*, pertencente à família das Malvaceae, apresentam em diferentes proporções, efeitos antiinflamatórios e antimicrobianos, estes em bactérias Gram negativas e positivas e que a atividade antiinflamatória da *Malva parviflora* é devida ao sinergismo de seus compostos. Por seus resultados, o gel de natrosol incorporado com 20% de *M. sylvestris,* pode ter uma atuação semelhante ao gel proveniente da associação da *Myracrondruon urundeva* (aroeira do sertão) e *Lippia sidoides* (alecrim pimenta), as quais reduzem citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-1β em tecido gengival de animais, semelhança que pode ser sugerida pela presença de taninos nas plantas (BOTELHO *et al*., 2007)

Ações concomitantes como antiinflamatória e cicatrizante, semelhantes às da *M. sylvestris,* são encontradas em diversas outras plantas como, por exemplo, a *Curcuma zedoarea*, *Plantago major* e *Calendula officinalis* (BUFFON *et al.,2001*), aliando assim, os dois efeitos, podemos oferecer uma explicação inicial, mas ainda necessitando de vários estudos complementares, dos benefícios que o uso popular da *M. sylvestris* proporciona.

7. CONCLUSÃO

- O extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* inibe *a* liberação das enzimas MPO e NAG, na doença periodontal induzida por ligadura, em um período de tratamento superior a 15 dias;
- O extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* inibe a reabsorção óssea horizontal e proximal, na doença periodontal induzida por ligadura, em período de tratamento superior a 15 dias;
- O extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* inibe a liberação de NO em fibroblastos gengivais estimulados por LPS;
- O extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* acelera a cicatrização de lesão palatina e inibe a liberação da enzima MPO em área de lesão;
- Sugere-se que a *M. sylvestris* tem ação antiinflamatória e cicatrizante, pela ação sinérgica de seus compostos, mas necessitando de mais estudos para demostrar através de qual mecanismo essas ações ocorrem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AZOUBEL, M. C. F.; MENEZES, A. M.A.; BEZERRA, D.; ORIÁ, R. B.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 40, p. 117-125, 2007.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392 (6673), p. 245-52, 1998.

BARTOLD, P. M. A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. **Journal of Dental Research**, v. 69(1), p. 7-19. 1990.

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

BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 613-616, 2002.

BJÖRNSSON, M. J.; VELSCHOW, S.; HAVERNOSE-POULSEN, A.; SCHOU, S.; HOLMSTRUMP, P. The influence of diet consitence, drinking water and bedding on periodonal disese in Sprague-Dawley rats. **Journal of Periodontology Research**, v. 38, p. 543-550, 2003.

BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; CARVALHO, C. B. M.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; VALE, M. L. ; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Lippia sidoides and Myracrodruon urundeuva gel prevents alveolar

bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 471-478, 2007.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254(3), p. 197-215, 2003.

BRADLEY, P. P. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with a enzyme marker. **The journal of investigative dermatology**, v. 78(3), p. 206-9, 1982.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis, Plantago major* e *Curcuma zedorea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "*in vitro*". **Revista Visão Acadêmica**, v. 2(1), p. 31-38, 2001.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J.; ATTINGER, C. Wound Healing: An Overview. **Plastic Reconstruction Surgery**, v. 117, p. 1e-S, 2006.

CALDWELL, D. E.; ATUKU, E.; WILKIE, D. C.; WIVCHARUK, K. P.; KARTHIKEYAN, S.; KORBER, D. R.; SCHMID, D. F.; WOLFAARDT, G. M. Germ theory vs community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. **Science**, v. 284(5418), p. 1318-22, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 33, p. 179-189, 2000.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.

ÇETIN, E. Ö.; BUDUNELL, N.; ATLIHAN, E.; KARRIMAZ, L. In vitro studies on contollede-release cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin, and meloxican. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 1117-1121, 2004.

CHAMPAGNE, C.M. E.; BUCHANAN, W.; REDDY, M. S.; PREISSER, J. S.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. **Periodontology 2000,** v. 31, p. 167-180, 2003.

CHAVRIER, C.; COUBLE, M. L.; MAGLOIRE, H.; GRIMAUD, J. A. Connective tissue organization of healthy humam gingival. Ultrastructural localization of collagen types I-II-IV. **Journal of Periodontal Research**, v. 19(3), p. 221-9, 1984.

CHEN, J.; McCULLOCH, C. A.; SODEK, J. Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. **Archives of Oral Biology**, v. 38(3), p. 241-9, 1993.

CHO, M. I.; GARANT, P. R. Development and general structure of the periodontium. Periodontology 2000, v. 24(1), p. 9-27, 2000.

CLARK, R. A. Wound repair- overview and general considerations. In: **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: ed. Plenum Press. p. 3-50, 1996.

CORNELISSEN, A.; MALTHA, J.; VON DEN HOFF, H.; JAGTMAN, A. Palatal micoperiostal wound healing in the rat. **European Journal of Oral Science**, v. 107, p. 344-351, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5º ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbekian, v. 2, Manuais Universitários, 2002.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistents infections. **Science**, v. 284 (5418), p. 1318-22, 1999.

CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO,A.; ZARRELLI, A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. **Phytochemistry**, 67: 481-485, 2005.

DALE, B. A. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. **Periodontology 2000,** v. 30, p. 70-78, 2002.

DAYAN, S.; STASHENKO, P.; NIEDERMAN, R.; KUPPER, T. S. Oral Epithelial Overexpression of IL-1α Causes Periodontal disease. **Journal Dental Research**, v. 83(10), p. 786-790, 2004.

DELIMA, A. J.; KARATZAS, S.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1. The Journal of Infections Disease, v. 186, p. 511-516, 2002.

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

EMBERY, G.; WADDINGTON, R. Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. **Advances in Dental Research**, v. 8(2), p. 329-36, 1994.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-525, 2007.

EKUNI, D.; YAMAMOTO, T.; YAMANAKA, R; TACHIBANA, K.; WATANABE, T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. **Journal of Periodontology Research**, v. 38, p. 591-596, 2003.

FARINA, A.; DOLDO, A.; COTICHINI, V.; RAJEVIC, M.; QUAGLIA, M. G.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F. HPTLC and reflectance mode densiometry of anthocyanins in Malva sylvestris L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 203-211, 1995.

FENG, Z. & WEINBERG A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 50-76, 2006.

Fitoterápicos & Produtos Odontológicos. **Revista Racine**, 3(43): 26, 1998.

FIVES-TAYLOR, P. M.; MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; BRISSETTE, C. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. **Periodontology 2000**, 20: 136-167, 1999.

FINE, D. H.; MANDEL, I. D. Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13(5), p. 533-46, 1986.

FOKKEMA, S. J.; LOOS, B. G.; SLETGE, C.; VAN DER VELDEN, U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS) – stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. **Clinical Experimental Immunology**, v. 127, p. 374-378, 2002.

FRANK, S.; KAMPLER, H.; WETZLER, C.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHFTER, J. Large induction of the chemotactic cytocine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES. **Journal of Biochemistry,** v. 1, p. 265-273, 2000.

FUJISAWA, K.; MIYAMOTO, Y.; NAGAYAMA, M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 32, p. 358-366, 2003.

GALVÃO, M. P. A.; CHAPPER, A.; RÖSING, C. K.; FERREIRA, M. B. C.; SOUZA, M. A. L. Methodological considerations on descriptive studies of inducid periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17(1), p. 56-62, 2003.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontology 2000, v. 35, p. 21-41, 2004.

GENCO, R. J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v. 67(10 Suppl), p. 1041-9, 1996.

GOMES, D. A. S. Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase. **Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista**, 2006.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature,** v. 3. p. 23-35, 2003.

GRAVES, D. T.; DELIMA, A. J.; ASSUMA, R.; AMAR, S.; OATES, T.; COCHRAN, D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, p. 69, v. 1419-1425, 1998.

GROENEVELD, M. C.; EVERTS, V.; BEERSTEN, W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingival of the rat mola: its relation to cementum formation. **Journal of Dental Research**, v. 74(7), p. 137-81, 1995.

GUARRERA, P. M. Tradicional phytotherapy in Central Italy. **Fitoterapia**, v. 76, p. 1-25, 2005.

GUSTAFSSON, A.; ITO, H.; ASMAN, B.; BERGSTRÖM, K. Hyperreactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, p. 126-129, 2006.

HAKKINEN, L.; UITTO, V. J.; LARJAVA, H. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 127-152, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, L. C.; VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. **Journal of Dental Research**,. V. 84, p. 154-159, 2005.

HUJOEL, P. P.; CUNHA-CRUZ, J.; SELIPSKY, H.; SAVER, B. G. Abnormal pocket depth and gingival recession as distinct phenotypes. **Periodontology 2000,** v. 39, p. 22-29, 2005.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 10, p. 332-245, 1975.

KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E. Resolution of Inflammation in Periodontitis. **Journal of Periodontology**, .v. 76(11), p. 2168-2174, 2005.

KANTARCI, A., HASTURK, H. & VAN DYKE, T. E. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 144-163, 2006.

KEILA, S.; NEMCOVSKY, C. E.; MOSES, O; ARTZI, Z.; WEINREB, M. *In vitro* Effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v. 83(2), p. 134-138, 2004.

KIM, H; SON, K; CRANG, H.; KANG, S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacologic Science**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KINANE, D. F.; DEMUTH, D. R.; GORR, S. U.; HAJISHENGALLIS, G. N.; MARTIN, M. H. Human variability in innate immunity. **Periodontology 2000**, v. 45, p. 14-34, 2007.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experiemental periodontal disease in rats: a review article. **Journal of Periodontology**, v. 62. p. 59-73, 1991.

KOIDE, M.; SUDA, S.; SAITOH, S.; OFUJI, Y.; SUZUKI, T. ;YOSHIE, H. *et al*. In vivo administration of IL-1 accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **Journal of Oral Pathology**, v. 24, p. 420-434, 1995.

KOSLOVSKY, A.; ARTZI, Z.; ISRAELI-TOBIAS, C.; HIRSHBERG, A. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, p. 164-171, 2007.

KUJIBU, D. A.; HERSHMAN, H. R. Dexamethason inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **The Journal of Biological chemistry,** v. 267, p. 7991-4, 1992.

KULIDJIAN, A. A.; INMAN, R.; ISSEKUTZ, T. B. Rodent models of lymphocyte migration. **Seminars in immunology**, v. 11, p. 85-93, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N (Eds.), **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**, seventh ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2005, pp. 47-86.

LAH, T. T.; BABNIK, J.; SCHIFFMAN, E.; TURK, V.; SKALERIC, U. Cysteine proteinases and inhibitors in inflammation their role in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 64(5-Suppl), p. 485-91, 1993.

LASCALA, N. T.; MOUSSALI, N. H. **Compêndio Terapêutico Periodontal**. 3º ed. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 1999.

LEENSTRA, T. S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; MALTHA, J. C. The healing process of palatal tissues after palatal surgery with and without implantation of membranes: an experimental study in dogs. **Journal of Materials science: Materials in Medicine,** v. 9, p. 249-25, 1998.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. American **Journal of Pathology**, v.78, p. 71-100, 1975.

LEPEKHIN, E.; GRON, B.; BEREZIN, V.; BOCK, E.; DABELSTEEN, E. Differences in motility patteren between human buccal fibroblasts and periodontal and skin fibroblasts. **European Journal of Oral Science**, v. 110, p. 13-20, 2002.

LINDEMANN, R. A.; ECONOMOUS, J. S.; ROTHERMEL, H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bactera and extracted lipopolisaccharides. **Journal of Dental Research**, v. 67(8), p. 1131-5, 1988.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**, 3º ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.

LOHINAI Z.; STACHLEWITZ , R.; SZEKELY, A. D.; FEHER, E.; DEZSI, L.; SZABO, C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life Sciences**, v. 70, p. 279-90, 2001.

LUKE, D. A. The structure and functions of the dentogengival junction and periodontal ligament. **British Dental Journal**, v. 172(5), p. 187-90, 1992.

MADEIRA, M. C. Anatomia da face. Bases anátomo-funcionais para a prática odontológica. 4º ed. Ed. Sarvier, São Paulo, 2003.

MADIANOS, P. N.; BOBTSIS, Y. A.; KINANE, D. F. Generationof inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32(6), p. 57-71, 2005.

MANSON, J. D.; ELEY, B. M. **Manual de Periodontia**. 3º ed. Livraria Editora Santos, 1999.

MANTLE, D.; GOK, M.A.; LENNARD, T. W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin disorders. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews,** v. 20(2), p. 89-103, 2001.

MARSHALL, R. Gingival defensins: linking the innate and adaptative immune responses to dental plaque**. Periodontology 2000**, v. 35, p. 14-20, 2004.

MELCHER, A. H. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. **Achives of Oral Biology**, v.15(12), p.1183-204, 1970.

MENEZES, A. M.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V. CARVALHO, C. B. RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v.76, p.1901-1909, 2005.

MIYAUCHI, M.; HIRAOKA, M.; OKA, H.; SATO, S.; KUDO, Y.; OGAWA, I.; NOGUCHI, K.; ISHIKAWA, I.; TAKATA, T. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 739-746, 2004.

MIYAUCHI, M.; IJUHIN, N.; NIKAI, H.; TAKATA, T.; ITO, H.; OGAWA, I. Effect of exogenously applied prostaglandin E2 on alveolar bone loss-Histometric analysis. **Journal of Periodontology**, v. 63, p. 405-11, 1992.

MONCADA, S.; HIGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MORTON, R. S.; DONGARI-BAQTZOGLOU, A. I. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. **Journal of Periodontology**, v. 72(4), p. 461-9, 2001.

MUIÀ, C.; MAZZON, E.; MAIERE, D.; ZITO, D.; DI PAOLA, R.; DOMENICO, S.; CRISAFULLI, C.; BRITTI, D; CUZZOCREA, S. Pyrrolidine dithiocarbamate reduced experimental periodontitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 539, p. 205-210, 2006.

MULLER, H. P.; EGER, T. Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. **International Journal of Periodontics Restorative Dental,** v. 22(2), p. 72-83, 2002.

NAGASE, H. Actvation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biological Chemistry,** v. 378 (3-4), p. 151-60, 1997.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues and disease. **Periodontology 2000**, v. 40(1), p. 11-28(18), 2006.

NASSAR, C. A.; NASSAR O., P.; ABI RACHED, R. S. G.; SPOLIDORIO, L. C.; MARCANTONIO JUNIOR, E. Avaliação radiográfica do efeito da ciclosporina-A no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. **Revista de Odontologia da UNESP,** v. 29, p. 183-193, 2000.

NASSAR, C. A.; NASSAR O., P.; INAGAKI, N. S.; JÚNIOR, C. G. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença.periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. **Revista de Odontologia da UNESP,** v. 32, p. 125-130, 2003.

NEVILLE, B. D.; DAMM, D. D. **Patologia Oral & Maxilofacial** 2º ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOOM, D. E.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A.; Falvonoids: a review of probable machanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74(4), p. 418-25, 2001.

NOGUCHI, K.; SHITASHIGE, M.; ENDO, H.; KONDO, H.; YOTSUMOTO, Y.; IZUMI, Y.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Involvement of cyclooxygenase-2 in serum-induced prostaglandin production by human oral gingival epithelial cells. **Journal of Periodontal Research,** v. 36(2), p. 124-30, 2001.

NOHL, H. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. **Annals of Biology Clinical**, v. 52, p. 199-204, 1994

NOIRI, Y.; OZAKI, K.; NAKAE, H.; MATSUO, T.; EBISU, S. Na immunohistchemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis,* Campylobacter rectus and Actinomyces viscosus in human periodontal pockets. **Journal of Periodontal Research,** v. 32, p. 598-607, 1997.

NISHIHARA, T. & KOSEKI, T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontology 2000, v. 36, p. 14-26, 2004.

ODA, Y.; KAGAMI, H.; UEDA, M.Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of palatal mucosa. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 73-80, 2004.

OGURA, N.; SHIBATA, Y.; KAMINO, Y.; MATSUDA, U.; HAYAKAWA, M.; OIKAWA, T.; TAKIGUCHI, H.; IZUMI, H.; ABIKO, Y. Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 53(2), p.130-6, 1994.

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

PAGE, R. C. The etiology and pathogenesis of periodontitis. **Compendium Continum Education Dental,** v. 23, p. 11-14, 2002.

PAGE, R. C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H. E.; SEYMOUR, G. J.; KORNMAN, K.S. Advances in the pathogenisis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 216-48, 1997.

PANCHATCHARAM, M.; MIRIYALA, S.; GAYATHRI, V. S.; SUGUNA, L. Curcumin imprves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 290, p. 87-96, 2006.

PAQUETTE, D. W.; WILLIANS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 239-252, 2000.

PASTER, B. J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgengival plaque. **Journal of Bacteriology**, v.183(12), p. 3770-83, 2001.

PERSSON, G. R. Immune responses and vaccination agains periodontal infections. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32(s6), p. 39-53, 2005.

PHILLIPSON, J.D. New drugs from nature-it could be yew. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 2-8, 1999.

PIHLSTRON, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. Periodontal diseases. **The Lancet**, v.366, p. 1809-1817, 2005.

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

PRESHAW, P. M.; HEASMAN, P.A. Prostaglandin E2 concentrations in gingival crevicular fluid observations in untreated chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology,** v. 29(1), p. 15-20, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia** 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2007.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. Comparative evaluation of arachdonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. **Inflammation,** v. 17, p. 723-740,1993.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxiconomy**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REHER, V. G. S.; ZENÓBIO, E. G.; COSTA, F. O.; REHER, P.; SOARES, R. V. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. **Journal of Oral Science,** v. 49(4), p. 271-276, 2007.

RUSSEL, J. P.; DIAMOND, G; TARVER, A. P.; SCANLIN, T. F.; BEVINS, C. L. Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v. 64(5), p. 1565-8, 1996.

SANTOS, C. N.; TORRES, K.; LEONART, R. Plantas medicinais (herbarium, flora et scientia). **Scientia et Labor**, v.160, p. 1988.

SAUNDERS, K. B.; D'AMORE, P. A. An in vitro model for cell-cell interactions. **In Vitro Cell & Developmental Biology,** v. 28A, p. 521-528, 1992.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 30(1), p. 69-95, 2004.

SERHAN, C. N.; OLIW, E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in ciclooxygenase-initiated pathways. **Journal of Clinical Investigation,** v. 107(12), p. 1481-1489, 2001.

SEYMOUR, G. J.; GEMMEL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59(3), p. 167-173, 2001.

SHARMA, S. P.; AITHAL, K. S.; SRINIVASAN, K. K.; KUMAR, V.; KULKARNI, D. R.; RAJAGOPAL, P. K. Anti-inflammatory and wound-healing activities of the crude alcoholic extracts and flavonoids of *Videx leucoxylon*. **Fitoterapia**, v. 31, p. 263-265, 1990.

SCHENKEIN, H. A. Host responses in maitaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontology 2000**, 40: 77-93, 2006.

SCHROEDER, H. E. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. **International Review of Citology**, v. 142, p. 1-59, 1992.

SCHROEDER, H. E.; SCHERLE, W. F.; Cemento-enamel junction-reviseted. **Journal of Periodontal Research**, v. 23(1), p. 53-9, 1988.

SHALE, T. L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of Malva parviflora and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 325-330, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T.. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18(3), p. 385-405, 2004.

SILVA, T. M. A; AOYAMA, H.; HAUN, M.; FERREIRA, C. V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36(4), p. 237-239, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC; UFRGS, 2004.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F.; Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine,** v. 341, p. 738-46, 1999.

SKALERIC, U.; KRAMAR, B.; PETELIN, M.; PAVLICA, Z.; WAHL, S. M. CRANGES in TGF-β levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal

inflammation in humans and dogs. **European Journal of Oral Science**. v. 105, p.136-142, 1997.

SKALLI, O.; GABBIANI, G. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. In CLARK, R. A. F.; HENSON, P. **The molecular and cellular biology of wound repair**. Plenun Press, New York, p. 373-402, 1988.

SOUTHERLAND, J. H.; TAYLOR, G. W.; MOSS, K.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Commonality in chronic inflammatory disease: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. **Periodontology 2000,** v. 40, p. 130-143, 2006.

SOUZA, D. M.; ROSA, L. P.; RICARDO, L. H.; MORAES, L. C.; ROCHA, R. F. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfomérico. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 8(4), p. 77-84, 2005.

SQUIER, C. A.; KREMER, M. J.. Biology of oral mucosa and esophagus. **Journal National Cancer Institute Monographs**, v. 29, p. 7-15, 2001.

STERRETT, J. D. The osteoclast and periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13(4), p. 258-69, 1986.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery. **Drug Discovery** , v. 5, p. 39-41, 2000.

SUOMALAINEN, K.; SORSA, T.; UITTO, V.J.; VAUHKONEN, M.; LINDY, S. Characteristics of neutral proteases present in inflamed gingiva. **Scandinavian Journal of Dental Research,** v. 97, p. 346-354, 1989.

SUSILOWATI, H.; SANTOSO, A.S.; BARID, I.; SOSROCENO,W.. Rat periodontal fibroblast responses to bacterial lipoplysaccharide *in vitro.* **Journal Microbiology Immunology Infectology**, v. 35, p. 203-206, 2002.

SZPADERSKA, A. M.; ZUCKERMAN, J. D.; DiPIETRO, L. A. Differential injury responses in oral and cutaneous wounds. **Journal of Dental Research**, v. 82, p. 621-626, 2003.

VAN BEURDEN, H.; SNOEK, P.; VON DEN HOFF, J.; TORENSMA, R.; MALTHA, J.; JAGTMAN, A. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 66-71, 2006.

VAN BEURDEN, H.; VON DEN HOFF, J. W.; TORENSMA, R.; MALTHA, J.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. **Journal of Dental Research**, v. 84(10), p. 871-880, 2005.

VAN DER VELDEN, U. Purpose and problems of periodontal disease classification. **Periodontology 2000**, v. 39, p. 13-21, 2005.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82(2), p. 82-90, 2003.

VERPOORTE, R., MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

WANG, L.; YI-CHEN, T.; TZI-WEI, L.; JING-TING, H.; JUI-HUNG, Y.; MING-JIUAN, W. Distinctive antioxidante and antiinflammatory effects of flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9798-9804, 2006.

WEINBERG, M. A. Laboratory animal models in periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, p. 335-340, 1999.

WEINBERG, A.; KRISANAPRAKORNKIT, S.; DALE, B. A. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral application. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 9(4), p. 339-414, 1998.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**, v. 321(5), p. 327-9, 1989.

WERNER S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiology Review**, v. 83, p. 835-870, 2003.

XIA, Y. P.; ZHAO, Y.; MARCUS, J.; JIMENEZ, P. A.; RUBEN, S. M.; MOORE, P. A.; KHAN, F.; MUSTOE, T. A. Effects of keratinocyte growth factor- 2 (KGF-2) on wound healing in an ischaemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. The Journal of Pathology, v. 188(4), p. 431-438, 1999.

XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology,** v. 27, p. 722-232, 2000.

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