



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

JACKELINE DO NASCIMENTO TSURUMAKI

**Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de
abacate e soja (Piascledine) no tratamento da Doença
Periodontal induzida em ratos com artrite.**

ARARAQUARA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

JACKELINE DO NASCIMENTO TSURUMAKI

Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine) no tratamento da Doença Periodontal induzida em ratos com artrite.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

ARARAQUARA

2014

JACKELINE DO NASCIMENTO TSURUMAKI

Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine) no tratamento da Doença Periodontal induzida em ratos com artrite.

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 25 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

JACKELINE DO NASCIMENTO TSURUMAKI

NASCIMENTO: 16.03.1984 – Mogi das Cruzes SP

FILIAÇÃO: Henrique Tsurumaki

Esméria Francisco do Nascimento Tsurumaki

2006 – 2010: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2011 – 2012: Bolsa Técnica FAPESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2012 – atual: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de
Concentração: Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP



DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho a **DEUS**, sempre presente, me dando força durante o meu desânimo, sabedoria na escolha dos meus caminhos, inteligência esclarecendo minhas dúvidas e paciência para enfrentar os obstáculos que surgiram durante a realização de mais esse sonho.

Dedico também a minha **FAMÍLIA**, Henrique (pai), Esméria (mãe), Adelline (irmã) e Francis Henrique (irmão), por estarem ao meu lado em toda a minha vida, me apoiando, dando força para batalhar pelos meus objetivos, incentivando nos meus sonhos e lutando juntos, para eu ter mais um sonho realizado. Obrigado por vocês serem o meu alicerce serem MINHA VIDA!



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram presente em todo o percurso para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na presença de seu Magnífico Reitor Júlio Cezar Durigan.

À Faculdade de odontologia de Araraquara – FOAr, da Universidade estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon e de sua vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli e pela vice-chefe Profa. Dra. Andréa Gonçalves.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, pela oportunidade de ser aluna deste programa.

Especialmente a Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio por despertar meu interesse pela carreira acadêmica, por continuar acreditando no meu potencial, dando a chance de trabalharmos juntas conquistando novos conhecimentos e novas experiências. Obrigado por ser amiga-mãe em tantos momentos da minha vida e por acreditar em mim.

Ao doutorando Luis Guilherme Freitas de Paula por ter participado e ajudado na metodologia do trabalho, passando todos os seus conhecimentos e técnicas para trabalhar com ratos além de amenizar meus sentimentos de culpa sacrificando os mesmos.

Ao doutorando Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira por ter me ajudado, incentivado mais uma vez e ensinado estatística para os resultados deste trabalho, dando suporte, atenção e tempo para a finalização do mesmo.

A aluna de pós-doutorado Sabrina Garcia de Aquino por transmitir todo seu conhecimento em pesquisas com ratos na indução da artrite experimental e auxiliar nas fases de laboratório e análise dando mais segurança para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores Joni Augusto Cirelli e José Eduardo Cezar Sampaio por terem aceitado ser minha banca na qualificação, passando conhecimentos e dicas para melhorar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Periodontia Claudinha e Leandro pelo auxílio nos laboratórios, nos procedimentos e análises das peças, nos vários momentos de descontração que tivemos. Luana na obtenção das imagens, nos vários quebra-galhos, nas altas conversas e confissões. Zezé, Isa e Pri organizando materiais, agenda e toda nossa correria no dia a dia da Faculdade.

Aos meus familiares, que mesmo estando distantes me apoiam a todo o momento dando força, incentivo e amor para continuar.

Ao meu namorado, Ricardo Vieira “mormeu” por ter compreendido todo esse trajeto, todas as noites não dormidas, todos os finais de semana de biotério, todos os estresses, tendo sempre paciência, carinho, amizade, ajudando em tudo que fosse possível.

A todos meus amigos tanto de Araraquara como de Jundiaí, por terem me apoiado e acreditado junto comigo em mais uma grande realização de um sonho.



***"Não haverá borboletas se a vida
não passar por longas e silenciosas
metamorfoses"
Rubem Alves***



RESUMO

Tsurumaki JN. Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (Piascledine®) no tratamento da doença periodontal induzida em ratos com artrite [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

Atualmente no mercado se encontra o extrato de óleo insaponificável de abacate e soja, considerado potente anti-inflamatório, agente antioxidante e analgésico, eficaz no tratamento de distúrbios que afetam os tecidos conjuntivos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia deste medicamento no tratamento da doença periodontal induzida em ratos com artrite. Foram utilizados 60 ratos (*Rattus Norvegicus*) submetidos à indução de artrite por antígeno (AIA) e a indução da doença periodontal (DP) através da inserção de ligadura no segundo molar superior. Após a remoção das ligaduras, em todos os dentes foi realizada raspagem radicular (R). Os animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos, avaliados em três períodos experimentais (7, 15 e 30 dias). Grupo Controle (CTR); Grupo ASU; Grupo ASU e artrite (ASU/AR); Grupo AR. Após os períodos experimentais pós-tratamento, suas maxilas e articulação da pata dianteira foram removidos para processamento laboratorial. A porcentagem de volume ósseo nas regiões proximais foi analisada por microtomografia (MicroCT). Não houve diferenças entre os grupos, entretanto foi verificado na análise intragrupos que no grupo ASU/AR houve um aumento estatisticamente significativo na porcentagem óssea no período de 30 dias em relação ao período de 7 dias e no grupo AR um aumento na porcentagem óssea no período de 30 dias em comparação ao período de 15 dias. Os períodos avaliados apresentaram leve infiltrado inflamatório, desorganização das fibras colágenas e integridade do cemento radicular. Dessa forma conclui-se que o ASU não adicionou efeito ao reparo periodontal após tratamento da periodontite induzida associada ou não a indução de artrite experimental em ratos.

Palavras-chave: Periodontite, Artrite experimental e Fitoterapia.



ABSTRACT

Tsurumaki JN. Evaluation of the effect of the avocado soybean unsaponifiables (Piascledine®) on the treatment of the induced periodontitis in rats with experimental arthritis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

The avocado/soybean unsaponifiables(ASU) is a drug that has been used for the treatment of rheumatoid arthritis(AR) and other connective tissue disorders due to their potent anti-inflammatory and analgesic effect and antioxidant. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of this drug on the treatment of the ligature-induced periodontitis in rats with experimental arthritis. Sixty rats were used in this experiment. The arthritis was induced in thirty rats by injection of specific antigen (AIA) and the periodontitis was induced in all the rats by a insertion of a cotton ligature in the periodontal sulcus of the second upper molar. The ligatures removal and the scaling was performed 7 days after the ligatures placement. The animals were randomly divided in four groups: Control (CTR), ASU, ASU/AR and AR. The animals were euthanized 7, 15 and 30 days after the treatments. The maxilla's and the joint of the front paw was removed to perform the analysis. The percentage of bone tissue in the proximal were analyzed by the micro CT. No statistical differences were detected between the groups. Regarding the intragroup analysis it was showed an enhance on the bone volume in the ASU/AR at 30 days compared with the period of 7 days, and an improve in bone volume the AR at 30 days compared with the period of 15 days. The descriptive histology showed that all the groups presented a mild inflammatory infiltrate, disorganization of collagen fibers and cementum integrity. In conclusion, the consumption of the ASU did not add any additional effect on the periodontal healing after the treatment of the ligature-induced periodontitis in rats with/without experimental arthritis.

Key-words: Experimental arthritis, Periodontitis, Phytotherapy



SUMÁRIO

SUMÁRIO

Introdução.....	16
Revisão de Literatura.....	18
Proposição.....	22
Material e Método.....	24
Resultados.....	33
Discussão.....	42
Conclusão.....	46
Referências.....	48
Anexos.....	58



INTRODUÇÃO

Introdução

A artrite reumatóide (AR) e a doença periodontal (DP) são doenças inflamatórias caracterizadas por desregulação da resposta inflamatória do hospedeiro. Ambas compartilham de fatores de risco e possuem vias patológicas em comum (Smit et al.⁵⁵, 2011). Este desequilíbrio imunológico é responsável pela maior parte dos danos teciduais observados em ambas as doenças (Garlet et al.²³, 2006; Sacre et al.⁵⁴, 2007).

A doença periodontal (DP) é crônica, infecciosa e assintomática afetando os tecidos de suporte em torno dos dentes, decorrente de um desequilíbrio entre a microbiota do biofilme dental e a resposta do hospedeiro (Gorska et al.²⁴, 2003). Ela está associada com diferentes espécies de bactérias, principalmente anaeróbias gram-negativas que estão envolvidas na perda progressiva de osso alveolar (Martinez et al.⁴³, 2009). A resposta do hospedeiro possui um papel fundamental, pois os danos teciduais ocorrem através da produção exarcebada da resposta inflamatória a partir da ativação de células do sistema imunológico. Neste processo encontram-se mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2 que são produzidos por fibroblastos, monócitos e macrófagos ativados nos sítios doentes (Ejeil et al.²⁰, 2003, Gorska et al.²⁴, 2003).

Alguns estudos estabelecem a associação entre AR e a DP (Mercado et al.⁴⁶, 2001; Liao et al.³⁸, 2009; Mirrielees et al.⁴⁷, 2010; Ogrendick et al.⁴⁸, 2009; Smit et al.⁵⁵, 2011). Os pacientes com AR têm maior probabilidade a doença periodontal e possuem níveis mais elevados de inflamação periodontal, perda dental, maior frequência de sítios com perda de inserção avançada e bolsas periodontais mais profundas em comparação a indivíduos saudáveis (Bartold et al.⁷, 2005; Mercado et al.⁴⁶, 2001; Pischon et al.⁵³, 2008; Ishi et al.³¹, 2008).

Uma vez tendo essa associação, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja - ASU (Piascledine) como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida por antígeno em ratos com artrite experimental.



REVISÃO DE LITERATURA

Revisão de Literatura

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica comum, de caráter autoimune e inflamatório crônico, que afeta cerca de 1 a 2% da população, sobretudo mulheres de meia idade (Culshaw et al.¹⁶, 2011; Lubberts⁴¹, 2008). Suas ações degenerativas estão ligadas a diversos eventos bioquímicos incluindo alta produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) que estimulam a degradação da matriz da cartilagem através da inibição da produção colágeno tipo II e proteoglicanos (Au et al.⁵, 2007; Boumediene et al.¹², 1999). Também relacionada com a violação da auto-tolerância e destruição de tecido ósseo articular mediante a presença intensa dessas citocinas pró-inflamatórias ativadas no sinóvio articular (Liao et al.³⁸, 2009; Bartold et al.⁸, 2010; Lubberts et al.⁴¹, 2008). Acredita-se que sua etiologia seja multifatorial englobando fatores genéticos e ambientais que levam a uma resposta imune alterada. Especificamente monócitos, células T e neutrófilos são encontrados nas cavidades articulares, promovendo a liberação de diversos mediadores inflamatórios em conjunto com células residentes e matriz, resultando nos danos teciduais (Barsante et al.⁶, 2008).

As citocinas pró-inflamatórias possuem importante papel no processo de destruição tecidual tanto na artrite como na doença periodontal. A IL1- β e TNF- α estimulam a produção de outras citocinas, enzimas degradativas e quimiocinas (Koenders et al.³⁴, 2006). Altos níveis de IL-17 tem sido detectadas no fluido sinovial de pacientes com artrite (Chabaud et al.¹⁴, 1999; Kotake et al.³⁵, 1999) bem como no fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal (Takahashi et al.⁵⁶, 2005; Johnson et al.³², 2004).

A presença de microrganismos como: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Prevotella intermedia* foram identificados em fluido sinovial de pacientes com AR e também na DP (Ogrendik et al.⁴⁸, 2009; Mirrieles et al.⁴⁷, 2010). Alguns estudos indicam que espécies destas bactérias em hospedeiro susceptível pode ser um fator gatilho possível para AR (Loyola-Rodriguez et al.⁴⁰, 2010; Detert et al.¹⁸, 2010).

O controle da doença periodontal e da inflamação por meio de tratamento não cirúrgico e higiene oral em pacientes com DP moderada e grave podem contribuir para uma redução dos sinais e sintomas de artrite reumatóide ativa, em termos de redução nos níveis séricos de TNF-alfa (Al-Katma et al.¹, 2007; Loyola-Rodriguez et al.⁴⁰, 2010).

Em 2009, Ogrendick et al.⁴⁸ fizeram uma revisão para avaliar a associação entre a artrite reumatóide (AR) e as bactérias periodontais. Os estudos clínicos de AR e da DP forneceram evidências para uma significativa associação entre as duas doenças indicando que as bactérias orais estão diretamente associadas à etiopatogenia da AR.

A correlação existente entre doença periodontal e artrite reumatóide se observa no estudo de Mirrielees et al.⁴⁷ (2010) que testou a hipótese de que AR influencia nos níveis de biomarcadores salivares da doença periodontal. Esta preocupação surgiu porque a saliva contém mediadores de inflamação e de degradação do colágeno que são elevadas no soro de pessoas com artrite reumatóide. Os autores concluíram que os biomarcadores salivares são altamente influenciados pela condição da doença periodontal e pela inflamação sistêmica resultante da artrite. Foram encontrados mediadores inflamatórios, tais como IL-1B, MMP-8 e o TNF- α em níveis elevados nas articulações inflamadas e na saliva de pacientes com AR, indicando que esta doença pode aumentar os níveis destes potenciais biomarcadores na saliva.

As opções atuais de tratamento para AR não são curativas e não conseguem reverter o processo de degradação, entretanto amenizam os sintomas clínicos, dor e melhoram a qualidade de vida. Entre os agentes farmacológicos usados estão os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os corticosteróides, porém o uso prolongado tem trazido efeitos colaterais adversos (Boileau et al.¹¹, 2009; Au et al.⁵, 2007; Heinecke et al.²⁷, 2010).

Atualmente no mercado se encontra o extrato de óleo insaponificável de abacate (*Persea gratissima*) e soja (*Glycine max*) - ASU, mais conhecido como Piascledine, extraídos do fruto e das sementes dessas plantas. Ele possui ação lenta, considerado potente anti-inflamatório, agente antioxidante e analgésico, com efeito prolongado, eficaz nos sintomas e excelente histórico de segurança (Herontin

et al.²⁹, 2003; Lippiello et al.³⁹, 2008). Estudos comprovam sua eficiência no tratamento de distúrbios que afetam os tecidos conjuntivos, tais como AR e a doença periodontal, (Au et al.⁵, 2007; Boumediene et al.¹², 1999, Kut-Laserre et al.³⁶, 2001, Yaman et al.⁵⁸, 2007). Na artrite sua ação esta relacionada com a diminuição do processo de destruição articular, da inflamação, da degradação da cartilagem e particularmente na redução da dor (Boileau et al.¹¹, 2009; Heinecke et al.²⁷, 2010; Lippiello et al.³⁹, 2008; Gabay et al.²², 2008; Maheu et al.⁴², 2014). O efeito benéfico do PIASCLEDINE® 300 sobre a cartilagem, demonstrado em estudos in vitro e in vivo (Appelboom et al.⁴, 2001; Cake et al.¹³, 2000; Henrotin et al.³⁰, 2006; Lippiello et al.³⁹, 2008; Au et al.⁵, 2007; Gabay et al.²², 2008), deve-se a sua ação condroprotetora e condroestimulante. Os condrócitos são os únicos componentes celulares presente na cartilagem articular fundamentais na progressão das doenças das articulações, pois produzem as metaloproteinases da matriz sob a influência da IL-1 β e TNF- α (Au et al.⁵, 2007; Boumediene et al.¹², 1999). Dentro de suas indicações este medicamento também é utilizado no tratamento coadjuvante das periodontites e gengivites (Vide bula – Anexo1).

Em 2006, Andriamanalijaona et al.³, realizou um experimento na qual avaliava o efeito da IL-1 β , sobre a TGF- β e a BMP-2 em ligamento periodontal e células ósseas alveolares. Células humanas do ligamento periodontal e do osso alveolar foram incubadas por 48 horas junto com ASU na presença ou não da IL-1 β e níveis estacionários de TGF- β e BMP-2. Os resultados indicaram que a IL-1 β diminui fortemente a expressão da TGF- β e da BMP-2 e que a utilização de ASU interferiu na ação dessa interleucina. Concluindo que o ASU pode exercer uma função inibidora sobre a IL-1 β principalmente em doenças periodontais.

Embora a literatura apresente estudos que comprovam a correlação entre a doença periodontal e a artrite reumatóide não há trabalhos relacionados ao tratamento de ambas com o extrato de óleo insaponificável de abacate e soja, tanto na AR como coadjuvante no tratamento da periodontite, sendo o objetivo deste estudo avaliar a influência deste medicamento nestas condições.



PROPOSIÇÃO

Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja - ASU (Piascledine) como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida por antígeno em ratos com artrite experimental.



Material e método

Material e método

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA n° 09/2012 (Anexo 2).

Neste estudo foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, Holtzman, pesando de 300 - 330g, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP onde foram alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com água, luz e temperatura controladas.

INDUÇÃO DA ARTRITE EXPERIMENTAL

Foi utilizado um modelo sugerido de artrite experimental induzida (AIA) por antígeno e foi realizada em 2 etapas (Pinto et al.⁵², 2010; Brackertz et al.¹⁰, 1977): 1) Imunização e 2) Desafio intra-articular.

- *Imunização*

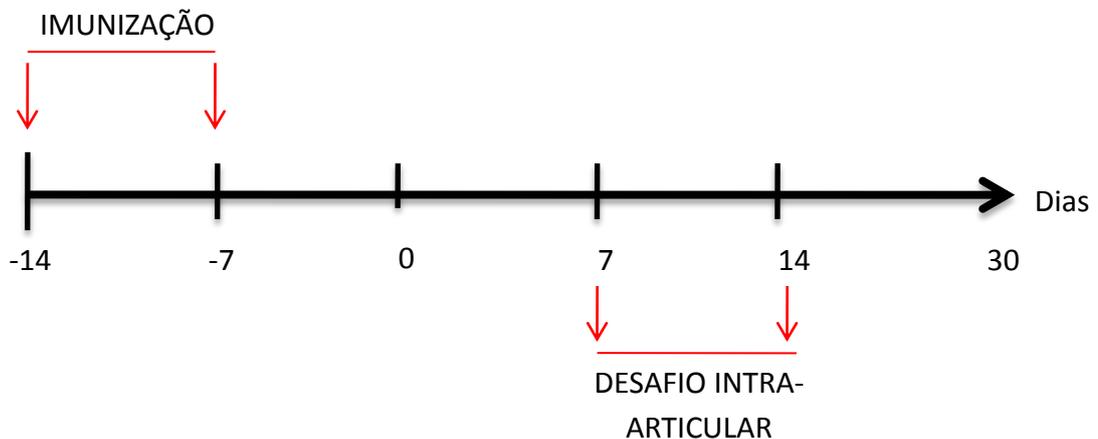
A imunização foi realizada através da administração de antígeno albumina de soro bovino metilada (mBSA). Os animais foram sensibilizados com 2 aplicações subcutâneas de 500µg de mBSA (Sigma, St. Louis, MO) diluídos em 0.2mL de emulsão contendo 0.1mL de solução salina e 0.1 mL de solução adjuvante de Freund completa (Sigma, St. Louis, MO) com intervalo de 7 dias entre as aplicações (Figura 1). Os animais não imunizados receberam injeções de solução salina nos mesmos períodos dos animais imunizados.

- *Desafio Intra-Articular*

Após 14 dias da última aplicação subcutânea do antígeno (período de imunização) (Figura 1) a artrite foi induzida através de aplicação intra-articular do antígeno mBSA (10 µg/cavidade articular) diluído em 10µL de PBS na articulação da

pata dianteira direita. As aplicações foram realizadas 2 vezes com intervalo de 7 dias (Figura 1), apenas no grupo de 7 dias a segunda aplicação foi realizada após 3 dias da primeira. Os animais que não receberam o desafio intra-articular receberam injeções de solução salina. Para a realização destes procedimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano (5% com O₂ para a indução e 3% de O₂ para manutenção) (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL), utilizando um vaporizador de isoflurano (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EUA).

Figura 1 – Delineamento da Indução da Artrite Experimental.



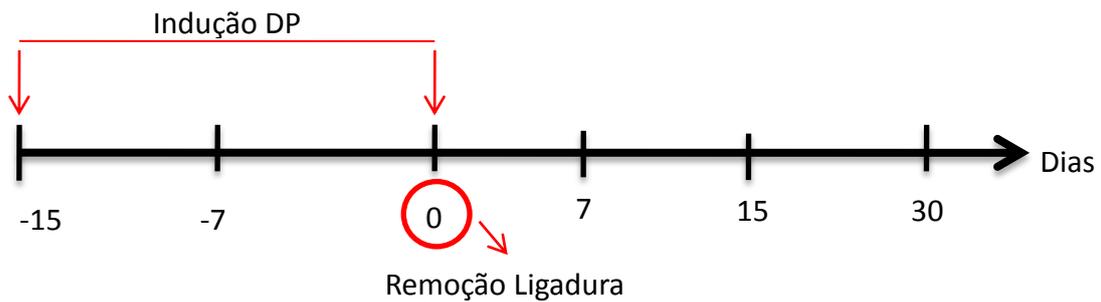
INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL (DP)

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina). Posteriormente, os ratos foram colocados em posição supina na mesa operatória e tiveram a boca retraída por um retrator para afastar mandíbula e língua. Ligaduras (fios de algodão, n^o24) foram inseridas através de sonda e pinça específicas na região subgengival em volta dos segundos molares superiores (Figura 2). Após um período de quinze dias, as ligaduras foram removidas e os tratamentos aplicados em cada grupo (Figura 3). Foi realizada raspagem subgengival com curetas de Gracey do tipo mini five 7-8, 11-12 e 13-14 (Hu-Friedy) de acordo com o grupo.

Figura 2 – Colocação das ligaduras no segundo molar superior.



Figura 3 – Delineamento da Indução da Doença Periodontal.



Os animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos, avaliados em três períodos experimentais (7, 15 e 30 dias) com 5 animais em cada grupo/período (Quadro 1). Nos animais dos grupos que não receberam medicamento (ASU) foram realizadas administração de soro fisiológico.

Quadro 1 - Distribuição do número de animais por grupo de acordo com o momento dos sacrifícios. Araraquara, 2014

PERÍODO GRUPO	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS	TOTAL
CTR	5	5	5	15
ASU	5	5	5	15
ASU/AR	5	5	5	15
AR	5	5	5	15
				60

GRUPO CTR – animais sem artrite e no momento da remoção da ligadura foi realizada raspagem subgengival com curetas de Gracey do tipo mini five 7-8,11-12 e 13-14 (Hu-Friedy).

GRUPO ASU – animais sem artrite e no momento da remoção da ligadura foi iniciado a administração do medicamento (Piasclédine 300, Expanscience Lab, France - 0.6 g/kg/dia por gavagem - Yaman et al, 2007), uma vez ao dia até o sacrifício dos animais e realização de raspagem subgengival (como no grupo CTR).

GRUPO ASU/AR – animais com artrite e no momento da remoção da ligadura foi iniciado a administração do medicamento (como no grupo ASU) e realização de raspagem subgengival (como no grupo CTR).

GRUPO AR - animais com artrite e no momento da remoção da ligadura foi realizada raspagem subgengival (igual ao grupo CTR).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A indução da artrite experimental (imunização e desafio) e da doença periodontal foram realizadas de acordo com o período final de cada grupo (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4 - Período Experimental 7 dias.

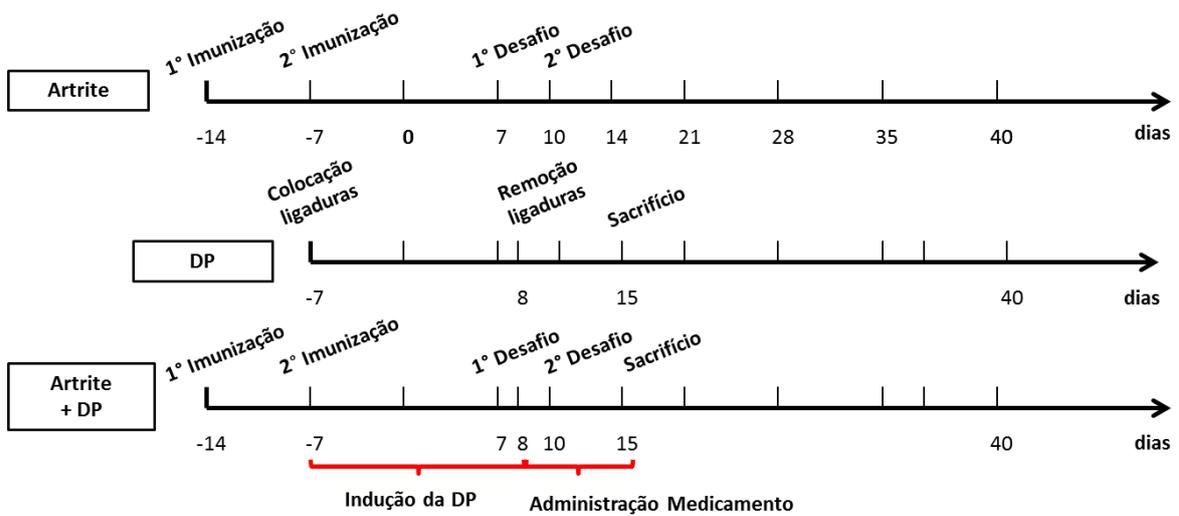


Figura 5 - Período Experimental 15 dias.

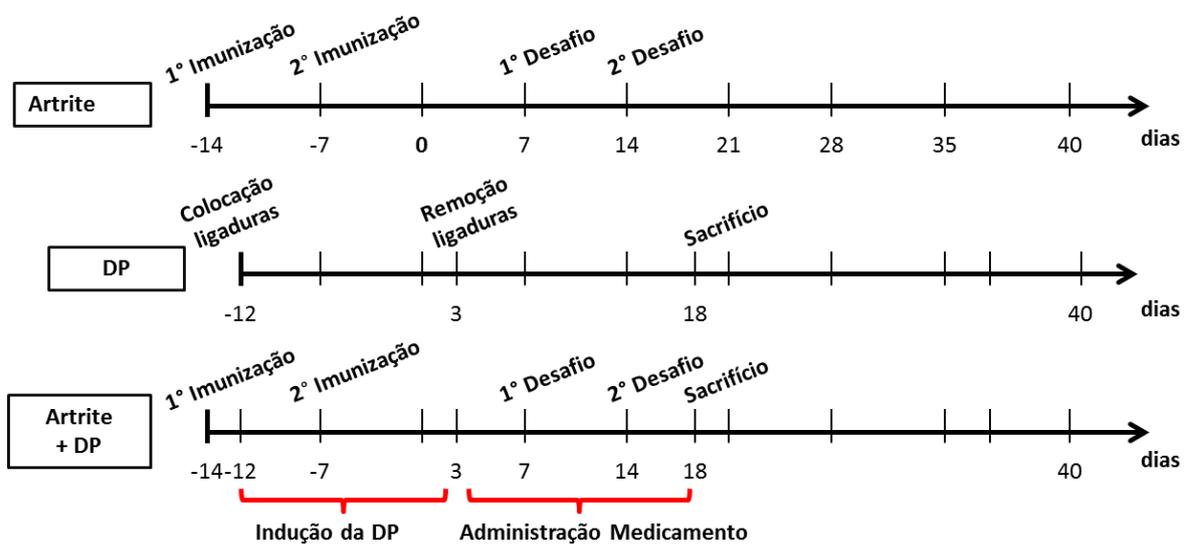
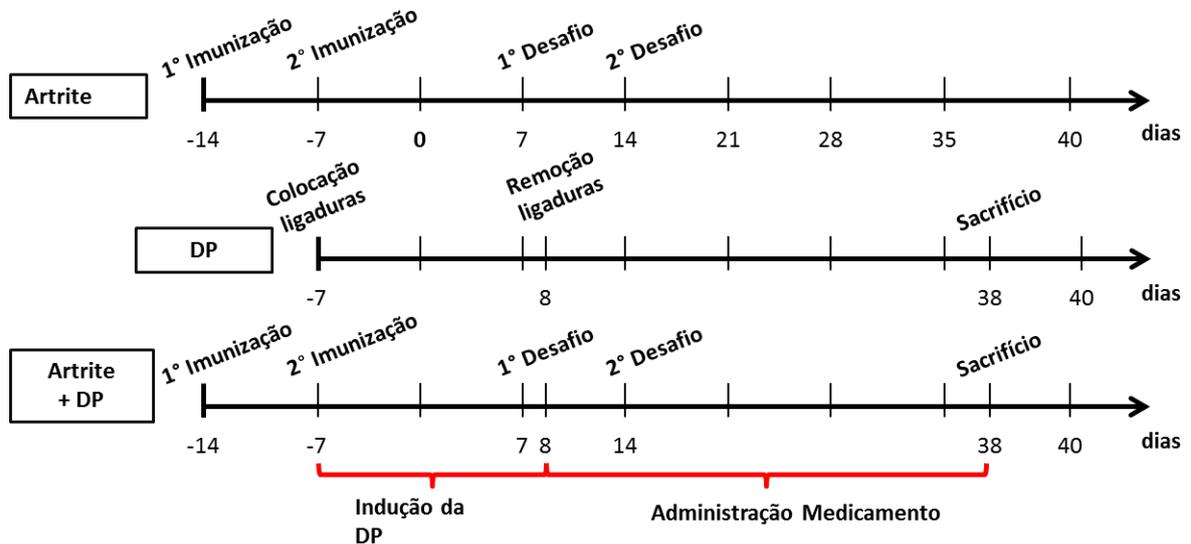


Figura 6 - Período Experimental 30 dias.



OBTENÇÃO DAS PEÇAS CIRÚRGICAS

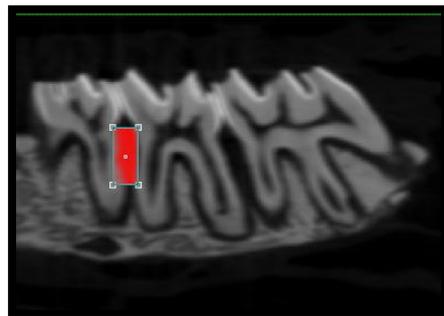
Após os períodos correspondentes os animais foram sacrificados com sobredose de hidrato de cloral a 20%. Logo após o sacrifício, as maxilas e os joelhos de cada animal foram removidos e fixados em paraformaldeído a 4% por um período de 24 horas para a manutenção das estruturas.

AVALIAÇÃO POR RADIOGRAFIA TRIDIMENSIONAL

Após a fixação, as peças foram scaneadas em um sistema de radiografia tridimensional - MicroCT (Skyscan, Aatselaar, Bélgica, 2003). Para cada peça foram obtidas imagens com espessura de 3 μ m utilizando a resolução de 18 μ m e filtro de alumínio 0.5mm. As imagens obtidas em 2D foram reconstruídas utilizando o software NRecon. As imagens reconstruídas foram rotacionadas em uma orientação-padrão utilizando o software DataViewer e analisadas com o software CTan, na qual foi estabelecido um limite de contraste de 65 a 255 tons de cinza, para distinguir

tecidos mineralizados (Skyscan, Aatselaar, Bélgica, 2003). A região de interesse (ROI – Figura – 7) foi determinada e padronizada para as proximais, mesial e distal (1,26 X 0.56 mm) e para a região de furca (1,26 X 1.15mm). A medição para as proximais foi padronizada a partir da junção cimento-esmalte do segundo molar superior determinando a região de interesse, resultando no percentual de volume ósseo presente (Figura 9). As amostras foram processadas e analisadas no laboratório de Microtomografia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Figura 7 – Imagens scaneadas em um sistema de radiografia tridimensional - MicroCT e analisadas pelo software CTan, padronizando a região de interesse (ROI) da proximal do segundo molar superior.



PROCESSAMENTO HISTÓLOGICO

Após a fixação das peças em paraformaldeído a 4%, estas foram lavadas em água corrente por 12hs e colocadas em solução de EDTA a 7% (pH 7,2 em PBS) para descalcificação por um período de aproximadamente 8 semanas, com 3 trocas semanais. Em seguida foram lavadas, reduzidas com o auxílio de um cabo de bisturi e lâmina nº 15, desidratadas em uma sequência crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A inclusão das peças em parafina foi realizada de maneira padronizada, com o auxílio de uma inclusora *Histo Embedder* (Leica Reichert & Jung Products). Os blocos de parafina, contendo 1 hemimaxila ou 1 articulação da pata dianteira, foram cortados em um micrótomo (American Optical 820 Rotary) numa espessura de 4µm. As hemimaxilas, mais especificamente, no

sentido méso-distal, ao longo eixo do dente. Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As hemimaxilas foram preparadas para uma posterior avaliação histológica e histométrica.

AVALIAÇÃO DA ARTRITE

A inflamação articular foi avaliada histologicamente apenas para confirmação da artrite. Para isto, após o sacrifício, as articulações totais da pata dianteira foram isoladas (Figuras 4, 5 e 6 – período experimental 30 dias – 38 dias, período experimental 15 dias – 18 dias e período experimental 7 dias – 15 dias), sendo selecionados 6 articulações da pata dianteira de cada grupo: 2 sem AIA (um tratado com soro, outro com medicamento) e 4 com AIA (2 tratado com soro e 2 tratado com medicamento) as peças foram fixadas durante 48 horas em paraformaldeído a 4% (PFA) e em seguida descalcificadas em solução de EDTA a 7% (pH 7,2 em PBS) para posterior inclusão em parafina. Foram confeccionadas 3 lâminas para cada articulação, cortes sagitais seriados de 6µm foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E) sendo analisados os seguintes parâmetros: espessura sinovial, infiltrado inflamatório e de erosão da cartilagem/osso (Figura 8).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados gerados por essa análise eram numéricos e devido a isso o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi avaliar se os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central. O teste determinou que os dados se distribuíram de acordo com a normalidade ($p < 0.05$) e devido a isso, testes paramétricos foram aplicados para a análise inferencial dos dados. O teste one-way anova complementado pelo teste de Tukey foi aplicado para avaliação dos dados entre os grupos em determinado período de tempo e dentro de cada grupo variando-se os períodos de avaliação. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança ($p < 0.05$).

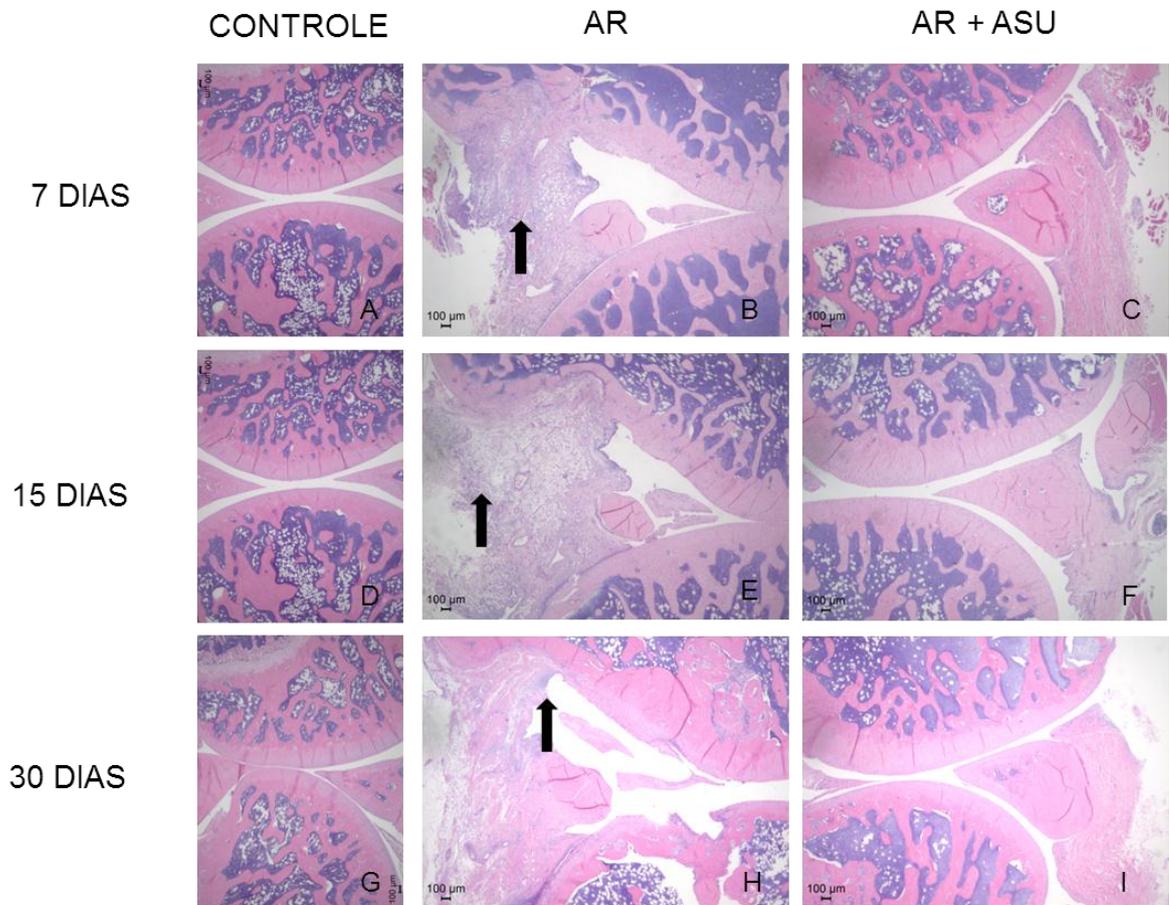


RESULTADO

RESULTADO

1) AVALIAÇÃO DA ARTRITE

Figura 8 – Fotomicrografia região de articulação da pata com inflamação articular (↑) e destruição óssea confirmando artrite local. (Aumento de 10x, H&E).



2) ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.1 Análise do volume ósseo interproximal por micro-CT

Foi verificado que não houve diferenças entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados. Entretanto foi verificado que no grupo ASU/AR houve um aumento estatisticamente significativo na % óssea no período de 30 dias em relação ao período de 7 dias ($p < 0.01$) e no grupo AR foi verificado um aumento na % óssea no período de 30 dias em comparação ao período de 15 dias ($p < 0.05$). A Tabela 2 e o Gráfico 1 expõe a média e desvio padrão dos valores de % óssea em todos os grupos.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da análise do volume ósseo interproximal (%) avaliado por micro-CT em todos os grupos. Araraquara, 2014

Grupos/Período	7 dias	15 dias	30 dias
CTR	31.80±13.42	27.61±8.97	31.34±4.32
ASU	35.10±11.46	30.99±3.64	34.00±15.63
ASU/AR	24.33±3.62 ^a	31.78±2.57	37.99±8.12 ^a
AR	30.99±4.34	25.80±4.53 ^b	38.57±10.06 ^b

*Letras semelhantes significam diferenças estatisticamente significativas intragrupos (One-way Anova c/Tukey)

Figura 9 – Imagem de hemiarcada de maxila superior feita pelo sistema de radiografia tridimensional – MicroCT e analisada pelo software CTan, para avaliar a porcentagem de volume ósseo.

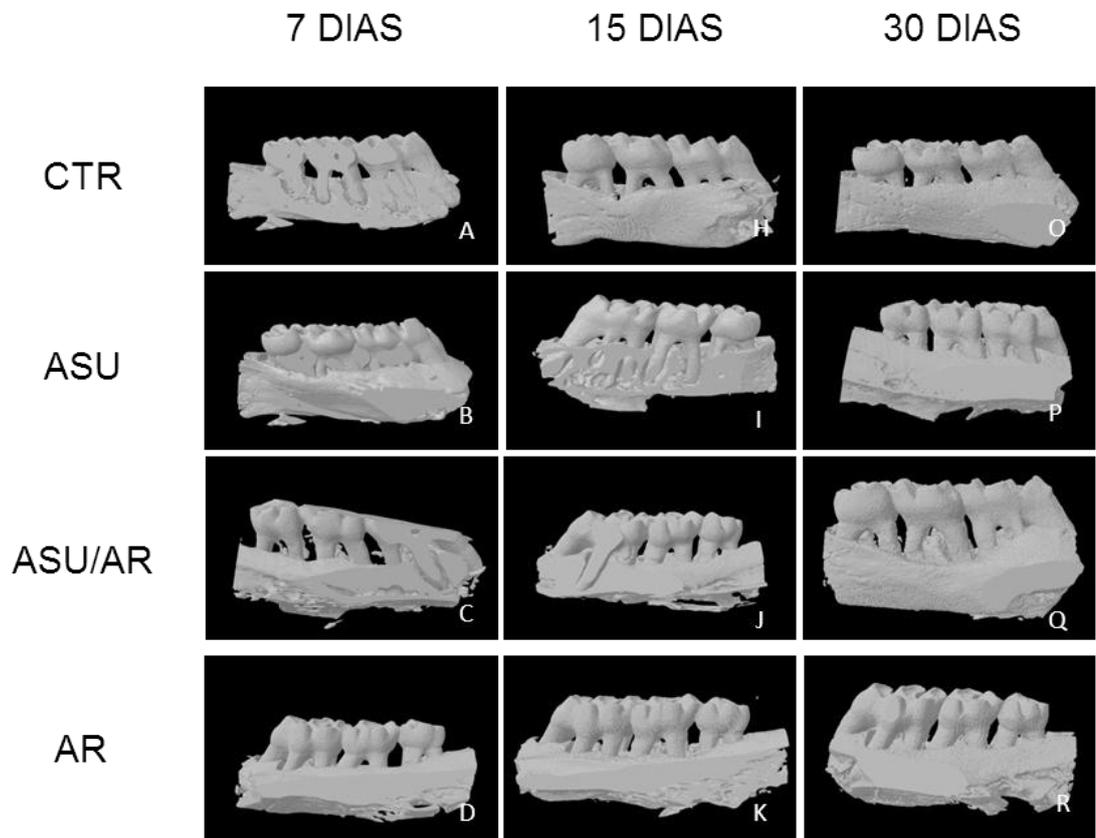
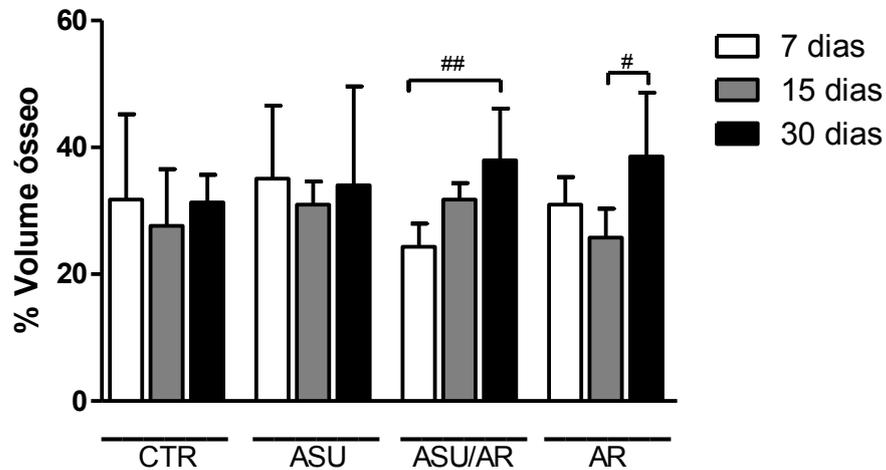


Gráfico 1 - Média e desvio padrão da análise do volume ósseo interproximal avaliado por micro-CT em todos os grupos.



#p<0.05; ##p<0.01- Diferenças dentro de cada grupo(One-way Anova c/ Tukey)

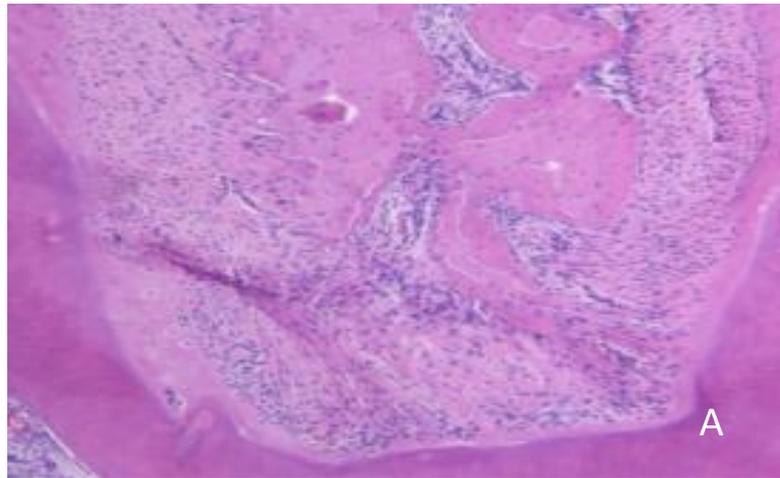
3) *Descrição Histológica*

Os grupos avaliados apresentaram padrão histológico semelhante em todos os períodos de avaliação, devido a isso, as características histológica foram descritas em conjunto. Foi verificado aos 7 dias a presença de um leve infiltrado inflamatório na região do teto da furca, presença de vasos sanguíneos associados a esse infiltrado e nas proximidades do tecido ósseo associado a regiões com desorganização das fibras colágenas e integridade do cemento radicular. Os padrão histológico aos 15 e 30 dias foram semelhantes em todos os grupos. Nesses períodos foi observado uma evolução com relação ao quadro observado no período de 7 dias aonde foi verificado uma redução no infiltrado inflamatório que foi substituído por fibras colágenas organizadas, associado a uma redução da presença de vasos sanguíneos e organização do tecido ósseo com presença linhas de reversão que demonstraram a presença de neoformação óssea em todos os grupos. Foi observado raramente a formação de epitélio no teto da furca de algumas amostras, porém essa distribuição não se concentrou em nenhum dos grupos avaliados (Figura 10).

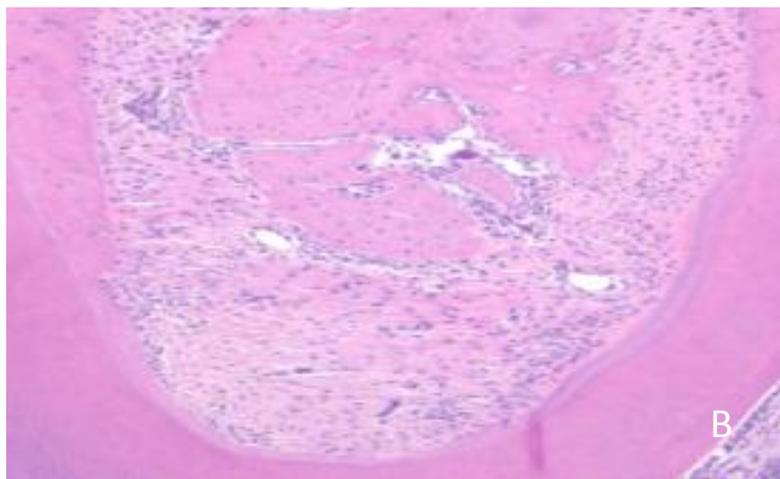
Figura 10 – Fotomicrografia da região de furca, ilustrando área total de furca e tecido ósseo presente nos respectivos períodos experimentais - Aumento de 5x, H&E (Continua)

CTR

7 DIAS



15 DIAS



30 DIAS

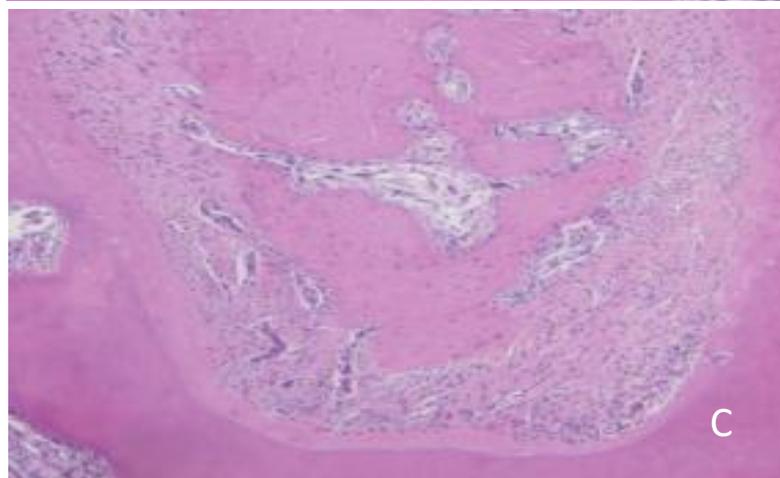
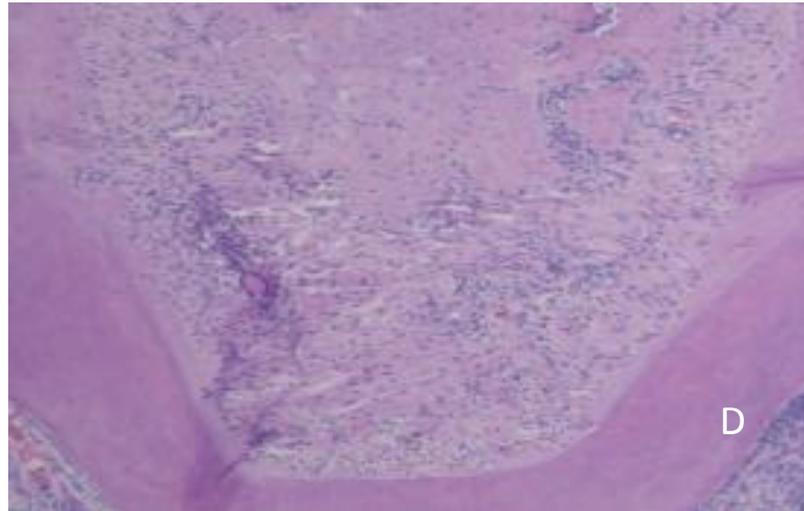


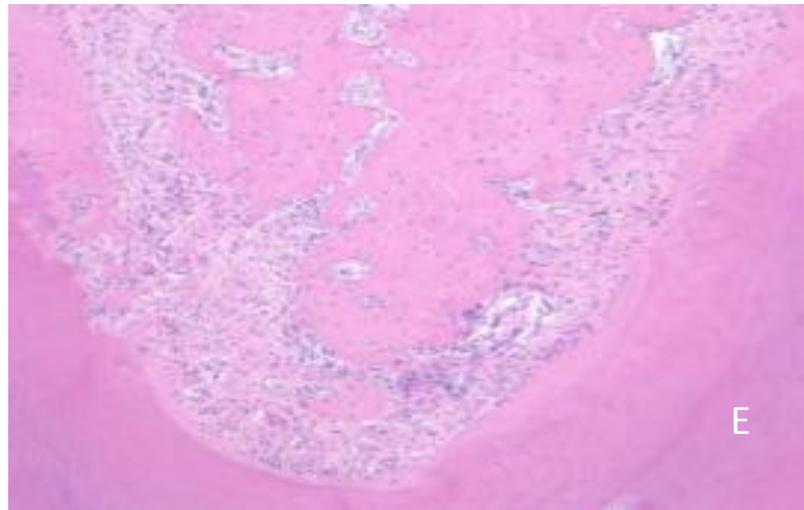
Figura 10 – Fotomicrografia da região de furca, ilustrando área total de furca e tecido ósseo presente nos respectivos períodos experimentais - Aumento de 5x, H&E (Continuação)

ASU

7 DIAS



15 DIAS



30 DIAS

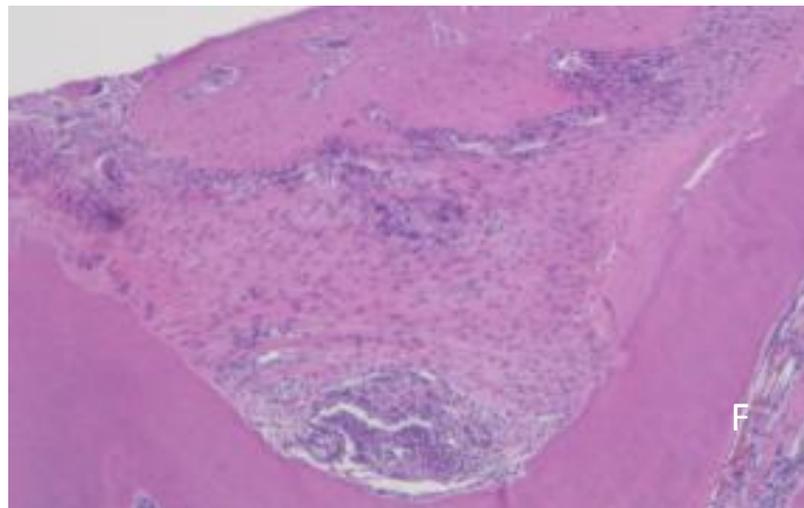
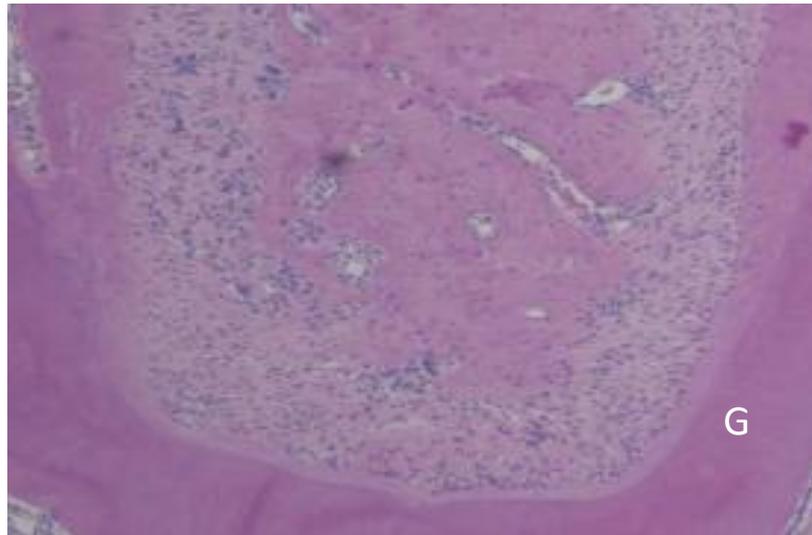


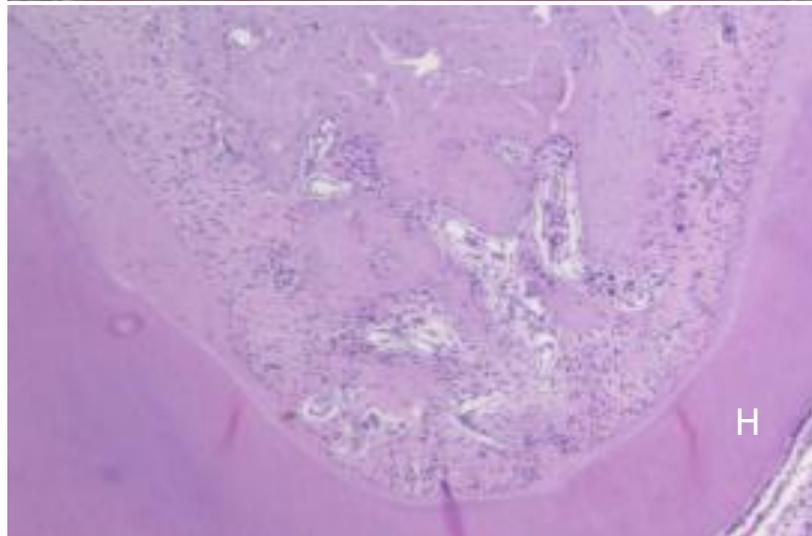
Figura 10 – Fotomicrografia da região de furca, ilustrando área total de furca e tecido ósseo presente nos respectivos períodos experimentais - Aumento de 5x, H&E (Continuação)

ASU/AR

7 DIAS



15 DIAS



30 DIAS

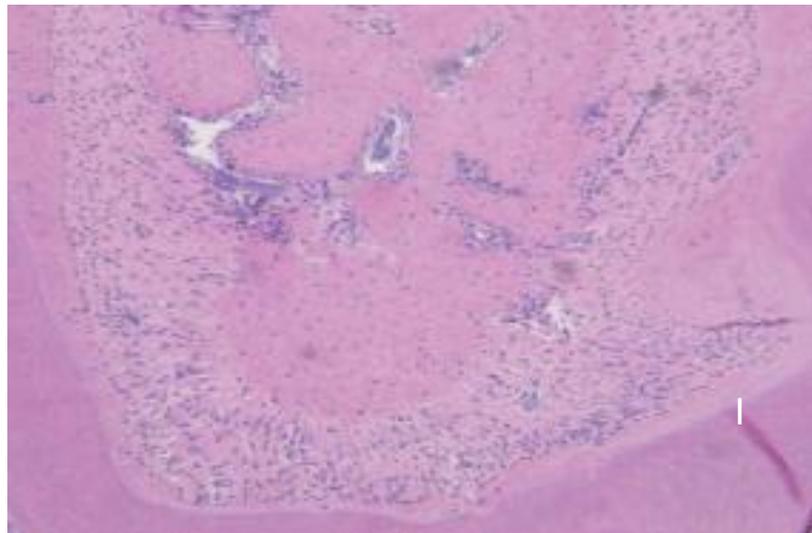
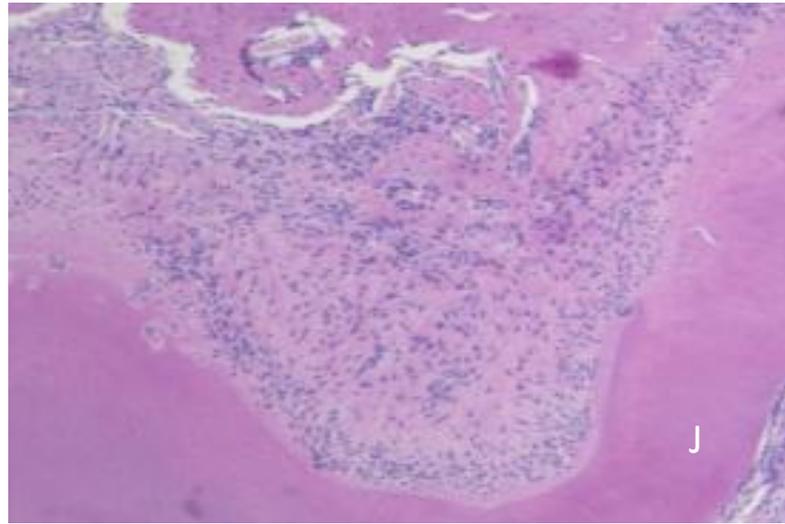


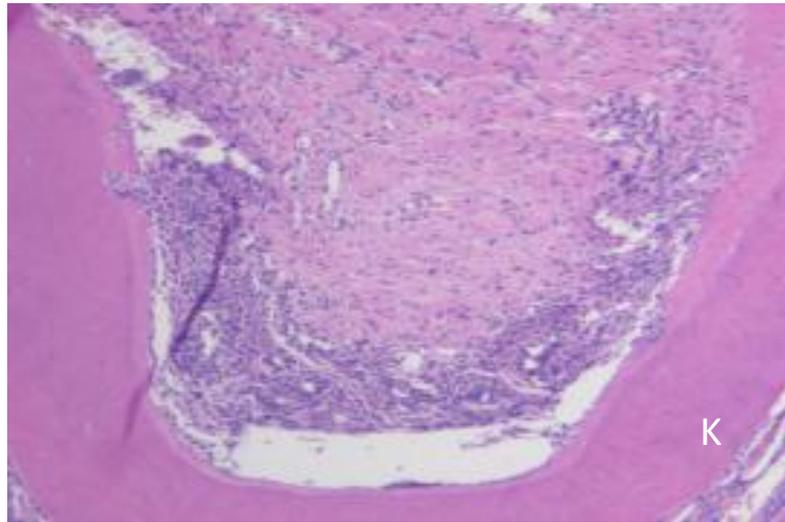
Figura 10 – Fotomicrografia da região de furca, ilustrando área total de furca e tecido ósseo presente nos respectivos períodos experimentais - Aumento de 5x, H&E (Conclusão)

AR

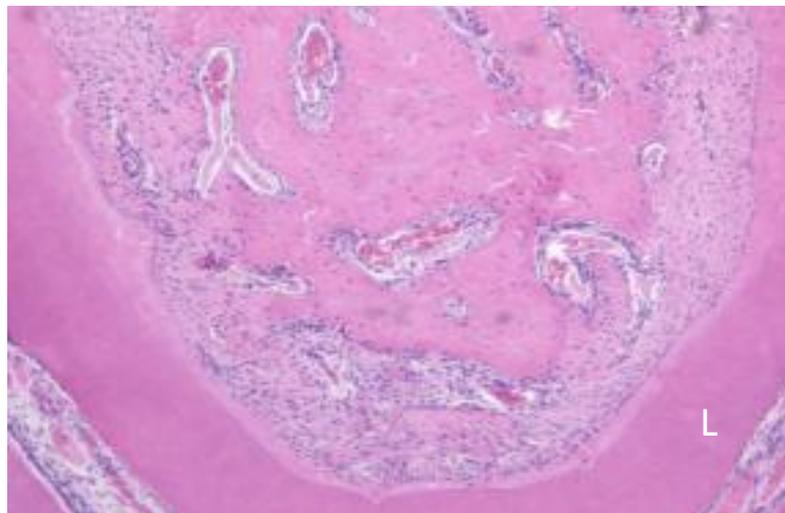
7 DIAS



15 DIAS



30 DIAS





DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou por meio de análise microtomográfica o efeito do ASU sobre o reparo ósseo periodontal associado ao tratamento da periodontite induzida em ratos com e sem artrite reumatóide. Foi verificado que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados com relação à porcentagem de tecido ósseo nas regiões interproximais.

Esse resultado demonstrou que o medicamento não adicionou nenhum efeito sobre a raspagem no que concerne a indução de formação óssea em animais com e sem artrite e isso pode ter ocorrido devido ao modelo utilizado de reparo nesse estudo já que tem sido demonstrado que a remoção da ligadura por si só já promove o reparo do tecido ósseo (Coimbra et al.¹⁵, 2011; Pavone et al.⁵⁰, 2014), fato esse que foi confirmado nesse estudo pois houve estatisticamente maior porcentagem de osso aos 30 dias em comparação com o período de 7 dias nos grupos ASU+AR e AR. Adicionalmente a isso, como a inserção de ligaduras está associada a formação de uma microbiota que estimula a destruição óssea (Graves et al.²⁵, 2008) a sua associação com a raspagem pode reduzir a carga de antígenos que também pode ter contribuído no processo de reparo nesse modelo. Outro fato importante a ser comentado é que apesar dos instrumentos utilizados nesse estudo serem de tamanho de ponta ativa reduzido, a utilização dos mesmos em bolsas periodontais rasas em humanos demonstraram causar um perda de inserção (Heitz-Mayfield et al.²⁸, 2002; Alves et al.², 2004) e provavelmente o trauma da raspagem também pode ter induzido o mesmo efeito nos períodos iniciais nesse modelo, e dessa forma, pode ter mascarado qualquer efeito que o ASU poderia ter causado no reparo periodontal.

Devido a maior expressão de mediadores biológicos da inflamação que induzem a reabsorção dos tecidos articulares que ocorrem na artrite reumatóide, e sendo esses mediadores também expressos no processo de reabsorção óssea que ocorre nas periodontites, tem sido investigado a relação entre essas duas doenças (Mercado et al.⁴⁵, 2000; Mayer et al.⁴⁴, 2013). Estudos demonstraram que pacientes com artrite reumatóide apresentam parâmetros mais severos de doença periodontal

em relação aos apresentados por indivíduos saudáveis (Havemose-Poulsen et al.²⁶, 2006; de Pablo et al.¹⁷, 2008), entretanto esses pacientes respondem de forma similar ao tratamento periodontal (Pinho et al.⁵¹, 2009) o que está de acordo com os resultados apresentados em nosso estudo.

A utilização de medicamentos utilizados para o tratamento da artrite reumatóide no tratamento adjunto da doença periodontal já foi indicado anteriormente (eg. Anti-inflamatórios não-esteroidais, Bisfosfonatos, anti-TNF α) e tem apresentado bons resultados clínicos (Williams et al.⁵⁷, 1989; Lane et al.³⁷, 2005; Yen et al.⁵⁹, 2008; Ortiz et al.⁴⁹, 2009; Mayer et al.⁴⁴, 2013). Entretanto devido aos efeitos colaterais e a atuação apenas no bloqueio das vias pró-inflamatórias esses medicamentos tem aplicação clínica limitada (Kantarci et al.³³, 2006). Tem sido proposto que a utilização de fármacos que além de bloquear as vias pró-inflamatórias também estimulasse vias de reparo tecidual (Bhatavadekar et al.⁹, 2009; Williams et al.⁵⁷, 1989; 2009; El-Sharkawy et al.²¹, 2010).

Devido a isso a utilização do ASU como agente modulador no tratamento da periodontite seria interessante, pois o mesmo demonstrou em estudos *in vitro* que avaliaram em osteoblastos, condroblastos e macrófagos o efeito do ASU demonstrando redução na expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL1 β , IL6, IL8, iNOS, TNF α , PGE2) (Henrotin et al.²⁹, 2003; Henrotin et al.³⁰, 2006; Au et al.⁵, 2007), de enzimas proteolíticas (MMP2, MMP3, MMP13) (Kut-Lasserre et al.³⁶, 2001; Henrotin et al.³⁰, 2006; Gabay et al.²², 2008) e ao mesmo tempo estimularam a expressão de inibidores de protease (TIMP 2 e TIMP3), de fatores de crescimento (TGF β 1, TGF β 2 e BMP2) (Boumediene et al.¹², 1999. Andriamanalijaona et al.³, 2006) e de produtos da matriz do conjuntivo (Colágeno e condroitina sulfato) (Henrotin et al.²⁹, 2003; Henrotin et al.³⁰, 2006; Lippiello et al.³⁹, 2008). Também foi verificado em estudos pré-clínicos que o ASU é um agente modificador da estrutura dos tecidos conjuntivos articulares previamente destruídos pela osteoartrite induzida (Coke et al.¹³, 2000; Boileau et al.¹¹, 2009). Adicionalmente o ASU induziu modificações estruturais detectadas radiograficamente em ensaios clínicos controlados e randomizados que avaliaram o efeito desse medicamento no tratamento da artrite reumatóide (Appelboom et al.⁴, 2001; Maheu et al.⁴², 2014), entretanto esses estudos descrevem que os efeitos de reparo proporcionados pelo ASU ocorrem de forma lenta (Boileau et al.¹¹, 2009).

Dessa forma, apesar dos supostos benefícios proporcionados pela utilização do ASU no reparo da periodontite é provável que devido a ação lenta do ASU sobre as vias de reparo o nosso estudo não teve duração suficiente para detectar um possível benefício. Adicionalmente, as regiões avaliadas (proximais) apresentavam defeitos horizontais que são situações mais difíceis de ocorrência de aumento de formação óssea (Ehnevid et al.¹⁹, 1997).

Dessa forma alguns tópicos precisam ser esclarecidos para melhor compreensão do real efeito do ASU no reparo periodontal associado raspagem em modelo de periodontite induzida. Utilizamos nesse estudo apenas uma dose do medicamento com base em um estudo que avaliou o efeito do ASU sobre a proteção de necrose em neurônios por hipóxia (Yaman et al.⁵⁸, 2007), sendo essa uma condição totalmente diferente da doença periodontal. Em nosso estudo foi verificado que essa dose causou melhora o aspecto histológico das articulações que foram submetidas a indução de artrite, entretanto não se sabe se essa dose realmente é a mais indicada para induzir efeitos benéficos no tratamento periodontal, principalmente pelo fato de estudos in vitro demonstraram que o efeito do ASU é dose dependente (Kut-Lasserre et al.³⁶, 2001; Au et al.⁵, 2007).

Outro ponto desconhecido é o efeito desse medicamento em condições que alteram o metabolismo ósseo. Partindo-se do pressuposto que a maioria das pessoas respondem bem ao tratamento periodontal não cirúrgico é provável que a terapia adjunta com agente modeladores da resposta imunológica deva ser aplicado em pacientes com resposta mais pobre ao tratamento (eg, fumantes, diabéticos, obesos) e dessa forma é provável que o impacto da utilização do ASU (caso realmente exista algum) deve ser mais expressivo nesses casos. Além disso, apesar de não ter sido verificado efeitos no ASU sobre o reparo associado ao tratamento da periodontite induzida em ratos, o efeito do mesmo em outros modelos experimentais (eg. Indução da periodontite sem remoção da ligadura, indução por injeção com LPS) em animais com artrite deve ser checado para avaliar se o ASU interfere com a progressão da perda óssea nesses modelos.

Com os resultados encontrados concluímos que o ASU não adicionou efeito com relação ao reparo periodontal após tratamento da periodontite induzida associada ou não a indução de artrite experimental em ratos.



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Dessa forma pode-se concluir que o ASU não adicionou efeito com relação ao reparo periodontal após tratamento da periodontite induzida associada ou não a indução de artrite experimental em ratos.



REFERÊNCIAS

Referências*

- 1) Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2007; 13 (3): 134-7.
- 2) Alves RV, Machion L, Casati MZ, Nociti Júnior FH, Sallum AW, Sallum EA. Attachment loss after scaling and root planing with different instruments. A clinical study. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(1): 12-5.
- 3) Andriamanalijaona R, Benateau H, Barre PE, Boumediene K, Labbe D, Compere JF, et al. Effect of interleukin-1beta on transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 expression in human periodontal ligament and alveolar bone cells in culture: modulation by avocado and soybean unsaponifiables. *J Periodontol.* 2006; 77(7): 1156-66.
- 4) Appelboom T, Schermans J, Verbruggen G, Henrotin Y, Reginster JY. Symptoms modifying effect of avocado/soybean unsaponifiables. *Scand J Rheumatol.* 2001; 30(4): 242-7.
- 5) Au RY, Al-Talib TK, Au AY, Phan PV, Frondoza CG. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthr Cartil.* 2007; 15(11): 1249-55.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 6) Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizarri C, et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvante-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(5): 992-1002.
- 7) Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol.* 2005; 76(11): 2066-74.
- 8) Bartold PM, Marino V, Cantley M, Haynes DR. Effect of *Porphyromonas gingivalis* induced inflammation on development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(5): 405–11.
- 9) Bhatavadekar NB, Williams RC. New directions in host modulation for the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(2): 124-6.
- 10) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 1977; 20(3): 841–50.
- 11) Boileau C, Martel-Pelletier J, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C, et al. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(2): R41.
- 12) Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guillou GB, Pujol JP. Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(1): 148-56.

- 13) Cake MA, Read RA, Guillou B, Ghosh P. Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU). *Osteoarthr Cartil.* 2000; 8(6): 404-11.
- 14) Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(5): 963-70.
- 15) Coimbra LS, Rossa C Jr, Guimarães MR, Gerlach RF, Muscará MN, Spolidorio DM, et al. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *J Periodontol.* 2011; 82(5): 767-77.
- 16) Culshaw S, McInnes IB, Liew FY: What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? *J Clin Periodontol.* 2011; 38(11): 106–13.
- 17) de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol.* 2008; 35(1): 70-6.
- 18) Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgerit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(5): 218.
- 19) Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Blomlöf L. Periodontal healing in horizontal and vertical defects following surgical or non-surgical therapy. *Swed Dent J.* 1997; 21(4): 137-47.

- 20)Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol.* 2003; 74(2): 196-201.
- 21)El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol.* 2010; 81(11): 1635-43.
- 22)Gabay O, Gosset M, Levy A, Salvat C, Sanchez C, Pigenet A, et al. Stress-induced signaling pathways in hyalin chondrocytes: inhibition by Avocado-Soybean Unsaponifiables (ASU). *Osteoarthr Cartil.* 2008; 16(3): 373-84.
- 23)Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs RANKL and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1): 12-20.
- 24)Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profile in inflamed ingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(12): 1046-52.
- 25)Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 89-105.

- 26) Havemose-Poulsen A, Westergaard J, Stoltze K, Skjødt H, Danneskiold-Samsøe B, Loch H, et al. Periodontal and hematological characteristics associated with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2006; 77(2): 280-8.
- 27) Heinecke LF, Grzanna MW, Au AY, Mochal CA, Rashmir-Raven A, Frondoza CG. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthr Cartil.* 2010; 18(2): 220-7.
- 28) Heitz-Mayfield LJ, Trombelli L, Heitz F, Needleman I, Moles D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (3): 92-102.
- 29) Henrotin YE, Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Guillou GB, Msika P, et al. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol.* 2003; 30(8): 1825-34.
- 30) Henrotin YE, Deberg MA, Crielaard JM, Piccardi N, Msika P, Sanchez C. Avocado/Soybean unsaponifiables prevent the inhibitory effect of osteoarthritic subchondral osteoblasts on aggrecan and type II collagen synthesis by chondrocytes. *J Rheumatol.* 2006; 33(8): 1668-78.
- 31) Ishi Ede P, Bertolo MB, Rossa C, Jr., Kirkwood KL, Onofre MA. Periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis. *Braz Oral Res.* 2008; 22(1): 72-7.
- 32) Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2004; 75(1): 37-43.

- 33)Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 144-63.
- 34)Koenders MI, Lubberts E, Van de Loo FA, Oppers-Walgreen B, Van den Bersselaar L, Helsen MM, et al. Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. *J Immunol*. 2006; 176(10): 6262-9.
- 35)Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999; 103(9): 1345-52.
- 36)Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil AL, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, et al. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP- 1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol*. 2001; 72(12): 1685-94.
- 37)Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*. 2005; 76(7): 1113-22.
- 38)Liao F, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. *Porphyromonas gingivalis* may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses*. 2009; 72(6): 732-5.
- 39)Lippiello L, Nardo JV, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of avocado/soy unsaponifiables on articular chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008; 5(2): 191-7.

- 40) Loyola-Rodriguez JP, Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patino-Marin N, Seymour GJ. Rheumatoid arthritis and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol.* 2010; 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5784.
- 41) Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine.* 2008; 41(2): 84-91.
- 42) Maheu E, Cadet C, Marty M, Moyses D, Kerloch I, Coste P, et al. Randomised, controlled trial of avocado-soybean unsaponifiable (Piascledine) effect on structure modification in hip osteoarthritis: the ERADIAS study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(2): 376-84.
- 43) Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patino-Marin N, Rizo-Rodriguez JC, Little JW, Loyola-Rodriguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(12): 1004–10.
- 44) Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Machtei EE. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor- α therapy. *J Periodontol.* 2013; 84(2): 136-42.
- 45) Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 2000; 27(4): 267-72.
- 46) Mercado F, Marshal R, Klestov A, Bartold P. A relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J Periodontol.* 2001; 72(6): 779–87.
- 47) Mirrielees J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, Ebersole JL, et al. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(12): 1068–74.

- 48)Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. *Mod Rheumatol.* 2009; 19(5): 453–6.
- 49)Ortiz P, Bissada NF, Palomo L, Han YW, Al-Zahrani MS, Panneerselvam A, et al. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors. *J Periodontol.* 2009 ; 80(4): 535-40.
- 50)Pavone C, Perussi LR, de Oliveira GJ, Scardueli CR, Cirelli JA, Cerri PS, et al. Effect of Er,Cr:YSGG laser application in the treatment of experimental periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 51)Pinho M de N, Oliveira RD, Novaes AB Jr, Voltarelli JC. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis and the effect of non-surgical periodontal treatment. *Braz Dent J.* 2009; 20(5): 355-64.
- 52)Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri Jr WA, Cunha FQ, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010; 148(2): 247-56.
- 53)Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79(6): 979-86.
- 54)Sacre SM, Andreakos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2007; 170(2): 518-25.
- 55)Smit MJ, Brouwer E, Vissink A, Van Winkelhoff AJ. Rheumatoid arthritis and periodontitis; a possible link via citrullination. *J Anaerobe.* 2011; 17(4): 196-200.

- 56)Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(4): 369-74.
- 57)Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Rolla A, Stubbs D, Teoh KW, et al. Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. *J Periodontol.* 1989; 60(9): 485-90.
- 58)Yaman M, Eser O, Cosar M, Bas O, Sahin O, Mollaoglu H, et al. Oral administration of avocado soybean unsaponifiables (ASU) reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Arch Med Res.* 2007; 38(5): 489-94.
- 59)Yen CA, Damoulis PD, Stark PC, Hibberd PL, Singh M, Papas AS. The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79(1): 104-13.



ANEXOS

Anexos

Anexo 1 - BULA DO MEDICAMENTO

Piascledine® 300

- Forma Farmacêutica
- Composição
- Informações ao Paciente
- Informações Técnicas
- Indicações
- Contra-Indicações
- Precauções e Advertências
- Interações Medicamentosas
- Reações Adversas
- Posologia
- Conduta na Superdosagem
- Pacientes Idosos

Piascledine® 300

Persea gratissima

Glycine max

Extrato insaponificável de abacate e soja

MEDICAMENTO FITOTERÁPICO

- Piascledine® FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO

Cápsulas - caixa com 15 cápsulas.

USO ADULTO

- Piascledine® COMPOSIÇÃO

Cada cápsula contém:

Extrato de óleo insaponificável de abacate e soja.....300,0 mg

(Insaponificável de abacate....100,0 mg; Insaponificável de soja 200,0 mg)

Excipientes: hidroxitolueno butilado, dióxido de silício coloidal, q.s.p. 1 cápsula

- Piascledine® INFORMAÇÕES AO PACIENTE

Ação esperada do medicamento: PIASCLEDINE® 300 estimula a recuperação dos tecidos conjuntivos e sua ação é mais efetiva nos casos de dores provocadas por artrose.

Cuidados de armazenamento: as cápsulas de PIASCLEDINE® 300 devem ser mantidas na embalagem original, à temperatura ambiente (15°C a 30°C), em local seco e protegido da luz.

Prazo de validade: não utilize medicamento com a validade vencida. Observe o prazo de validade impresso na embalagem. PIASCLEDINE® 300 tem validade de 36 meses a partir da data de fabricação.

Gravidez e lactação: informe seu médico sobre a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término. Informar ao médico se está amamentando. Não se recomenda o uso de PIASCLEDINE® 300 durante a gravidez ou a amamentação.

Cuidados de administração: siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento. Tome sempre a cápsula de PIASCLEDINE® 300 com um copo de água e junto com uma refeição. Não mastigue nem abra a cápsula.

Interrupção do tratamento: não interromper o tratamento sem o conhecimento de seu médico.

O tratamento pode perdurar por até 6 meses e deve ser seguido conforme as instruções de seu médico.

Reações adversas: informe seu médico sobre o aparecimento de reações desagradáveis.

Raramente, você poderá sofrer eructações com odor de óleo, o que pode ser evitado tomando sempre a cápsula junto com uma refeição.

"TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS".

Ingestão concomitante com outras substâncias: não há dados sobre a interação do produto com outras drogas; portanto, durante o tratamento com PIASCLEDINE® 300, tome somente os medicamentos prescritos por seu médico.

Contraindicações e precauções: informe seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início ou durante o tratamento. Não deve ser usado durante a gravidez e a lactação.

PIASCLEDINE® 300 é contraindicado nos casos de hipersensibilidade conhecida a qualquer componente da fórmula.

Durante o tratamento, visite regularmente seu médico e realize os exames complementares solicitados.

"NÃO TOME REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO, PODE SER PERIGOSO PARA A SUA SAÚDE".

- Piascledine® INFORMAÇÕES TÉCNICAS

CARACTERÍSTICAS

NOMENCLATURA OFICIAL

Abacate

Gênero: Persea

Espécie: gratissima

Variedades utilizadas: Fuerte e Hass

Autor do binômio: Gaemt

Família: Lauraceae

Soja

Gênero: Glycine

Espécie: max

Variedades utilizadas: Altona e Swift

Autor do binômio: (L.) Merrill

Família: Leguminosae (Fabaceae)

PIASCLEDINE® 300 é um composto de óleos insaponificáveis de abacate (*Persea gratissima*) e de soja (*Glycine max*), extraídos do fruto e das sementes dessas plantas, respectivamente, através do processamento dessas partes. Essa mistura consiste ainda em constituintes não glicéricos, como triterpenos e álcoois alifáticos, carotenóides, fitosteróis e tocoferóis.

Esses insaponificáveis comprovaram ser eficientes em osteoartroses dolorosas, nas quais diminuíram o curso da doença.

Osteoartrose - PIASCLEDINE® 300 pertence ao grupo das Drogas Sintomáticas de Ação Lenta para o Tratamento das Osteoartroses (Symptomatic Slow- Acting Drugs for Treatment of Osteoarthritis - SYSADOA).

O tratamento das osteoartroses busca diminuir o processo de destruição articular e, particularmente, da degradação da cartilagem. O efeito benéfico de PIASCLEDINE® 300 sobre a cartilagem, demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*, deve-se a sua ação condroprotetora e condroestimulante.

In vitro, PIASCLEDINE® 300 inibe a degradação dos proteoglicanos no tratamento agudo. O estímulo da síntese e da secreção de proteoglicanos pelos condrócitos

osteoartrósicos foi observado em tratamentos a longo prazo. Após a administração de dose única das frações isoladas, o óleo insaponificado de soja mostrou ter ação preponderante. Entretanto, quando administrado em doses repetidas, o óleo insaponificado de abacate demonstrou um efeito maior sobre a síntese de proteoglicanos. A combinação dos dois compostos permite a ação complementar entre ambos.

PIASCLEDINE® 300 conduz a um aumento de 20% a 80% na síntese de colágeno pelos sinoviócitos e pelos condrócitos articulares, respectivamente. Ao mesmo tempo,

PIASCLEDINE® 300 diminui em cerca de 50% a atividade da colagenase, enzima degradativa da cartilagem. Além disso, o produto interfere no efeito deletério da interleucina-1 nos condrócitos. A interleucina-1 exerce um importante papel na destruição da cartilagem articular. A atividade colagenolítica dessa citocina é reduzida pelo PIASCLEDINE® 300 e, portanto, ao impedir o efeito da interleucina-1, PIASCLEDINE® 300 permite a restauração da produção normal de colágeno e da malha de tecido conjuntivo.

O tratamento deve ter a duração de 3 a 6 meses e o seu efeito persiste por até 2 meses após o tratamento.

- Piascledine® INDICAÇÕES

PIASCLEDINE® 300 é indicado:

No tratamento dos quadros dolorosos de artrose de quadril e joelho;

Como coadjuvante do tratamento das periodontites e gengivites.

- Piascledine® CONTRAINDICAÇÕES

Nos casos de hipersensibilidade aos constituintes do produto.

- Piascledine® PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Gravidez e amamentação

Não existem estudos disponíveis sobre o uso de PIASCLEDINE® 300 em mulheres grávidas.

Portanto, não se recomenda a sua utilização durante a gravidez e a amamentação.

Pediatria

Não se recomenda o uso em crianças, pois não há estudos em pediatria.

- Piascledine® INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Não há dados sobre a interação do produto com outras drogas.

- Piascledine® REAÇÕES ADVERSAS

Podem ocorrer, raramente, eructações com odor lipídico que podem ser evitadas com a ingestão da cápsula durante a refeição.

- Piascledine® POSOLOGIA

1 cápsula de PIASCLEDINE® 300 ao dia, junto à refeição. A cápsula deve ser ingerida

inteira, com um copo cheio de água. Não mastigue nem abra a cápsula.

O tratamento deve perdurar por 3 a 6 meses nos casos de osteoartroses e por 1 a 3 meses nos casos de periodontopatias.

- Piascledine® CONDUITA NA SUPERDOSAGEM

Não há dados disponíveis sobre a administração de sobredose do produto. Nesses casos podem ocorrer náuseas e o paciente deve ser monitorado quanto às reações gastrintestinais.

- Piascledine® PACIENTES IDOSOS

Deve-se manter os mesmos cuidados recomendados para pacientes adultos.

"ATENÇÃO: ESTE PRODUTO É UM NOVO MEDICAMENTO E EMBORA AS PESQUISAS REALIZADAS TENHAM INDICADO EFICÁCIA E SEGURANÇA QUANDO CORRETAMENTE INDICADO, PODEM OCORRER REAÇÕES ADVERSAS IMPREVISÍVEIS AINDA NÃO DESCRITAS OU CONHECIDAS. EM CASO DE SUSPEITA DE REAÇÃO ADVERSA O MÉDICO RESPONSÁVEL DEVE SER NOTIFICADO".

Reg. MS- 1.0082.0144

Farm. Resp: Dr. José de Andrade - CRF-SP nº 6369

"VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA".

SOLVAY FARMA LTDA: Administração: Rua Sergipe,120 - CEP 01243-000 - São Paulo - SP - Brasil

Fone: (0xx11) 3257-9844 - Fax: (0xx11) 3257-6914 / 3259-7922 / 3259-7944 / 3231-3847

Matriz e Fábrica: Rua Salvador Branco de Andrade, 93 - CEP 06760-100 - Taboão da Serra - SP - Brasil

Fone: (0xx11) 4787-3100 - Fax: (0xx11) 4787-3191

Nº de lote, data de fabricação e de validade: vide cartucho e/ou rótulo.

Fabricado por: Laboratoires EXPANSCIENCE - FRANÇA

Embalado e distribuído por:

SOLVAY FARMA LTDA.

Rua Salvador Branco de Andrade, 93

Taboão da Serra - SP - Indústria Brasileira

CNPJ: 60.499.639/0001-95

SAC: 0800- 141500

- Laboratório

SOLVAY FARMA

Rua Salvador Branco de Andrade, 93. Taboão da Serra - SP

São Paulo/SP

Tel: 0800-141500

Anexo 2 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 09/2012

Araraquara, 09 de Maio de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 09/05/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação da eficácia do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (piascledine) na ósseointegração e no tratamento da doença periodontal induzida em ratos" (Proc. CEUA nº 09/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MARÇO/2015, devendo o Pesquisador Responsável providenciar a correção do Protocolo Inicial, fazendo constar a dosagem da medicação a ser administrada aos animais, nos mesmos moldes que se encontra discriminada no projeto de pesquisa.

Atenciosamente.

Profª Drª DÉBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI
Vice-Coordenadora no exercício da Coordenadoria da CEUA

À

Profª Drª ROSEMARY ADRIANA CHIÉRICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Jackeline do Nascimento Tsuramaki
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 25 de março de 2014
Jackeline do Nascimento Tsurumaki