



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Jackeline do Nascimento Tsurumaki

Avaliação do efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na periodontite experimental em ratos com artrite induzida.

ARARAQUARA

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Jackeline do Nascimento Tsurumaki

Avaliação do efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na periodontite experimental em ratos com artrite induzida.

Tese 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 Doutor em Odontologia.

Orientador: Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

ARARAQUARA

2017

Tsurumaki, Jackeline do Nascimento

Avaliação do efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na periodontite experimental em ratos com artrite induzida / Jackeline do Nascimento Tsurumaki. -- Araraquara: [s.n.], 2018

84 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Coorientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

1. Inflamação 2. Regeneração 3. Periodontite I. Título

Jackeline do Nascimento Tsurumaki

Avaliação do efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na periodontite experimental em ratos com artrite induzida.

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira - UNESP/FOAr

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli - UNESP/FOAr

3º Examinador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos - UNESP/ FOAr

4º Examinador: Profa. Dra. Sabrina Garcia de Aquino – UFPB – Vídeo Conferência

5º Examinador: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda – UNIARA

Araraquara, 27 de setembro de 2017

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 – 2014: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de
Concentração: Periodontia

Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014 – atual: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de
Concentração: Periodontia

Nível: Doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico este trabalho a **DEUS**, sempre comigo, não deixando eu me abater nem alimentar a idéia de desistir ou do próprio desânimo, me dando força, sabedoria e inteligência na escolha dos meus caminhos, esclarecendo minhas dúvidas e paciência para enfrentar os obstáculos que surgiram durante a realização de mais esse sonho, de mais essa fase em minha vida.

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, mesmo por tudo que passamos e continuamos a passar, sempre me apoiando, dando força, conselhos, incentivando e batalhando juntos no caminhar e desenvolvimento dos meus sonhos, dos meus objetivos, para eu ter mais uma conquista em minha vida. Obrigado por vocês serem o meu alicerce, serem a MINHA VIDA! Amo incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiverão presente em toda essa minha jornada para a realização deste trabalho e conquista deste título.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na presença de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e de seu vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

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

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

Especialmente a Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, por acreditar em mim por todos esses 11 anos dentro da Universidade e de sua própria vida, me adotando como mais uma de suas filhas, super mãezona. Por despertar meu interesse pela carreira acadêmica, por continuar acreditando no meu potencial, dando a chance de trabalharmos juntas e eu aprendendo a admirá-la a cada ano, conquistando novos conhecimentos e novas experiências. Obrigado por ser minha amiga-mãe em tantos momentos da minha vida e por acreditar em mim. Gratidão eterna.

Ao Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, meu padrinho de formatura, por ter me ajudado, incentivado, ensinado e feito a estatística para os resultados deste trabalho, orientação e participação em todo o projeto desde o início, dando suporte, puxão de orelha, palavra amiga, altas risadas e dedicando tempo e atenção para a finalização do mesmo. Só tenho a

agradecer por ter conhecido e ter a amizade de uma pessoa como você, sua garra e determinação só me fazem ter mais orgulho e admirá-lo cada vez mais. Sorte a minha, obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Luis Guilherme Freitas de Paula por ter participado e ajudado na metodologia do trabalho, passando seus conhecimentos e técnicas para trabalhar com ratos, além de amenizar meu desespero e sentimento de culpa no sacrifício dos mesmos.

A Profa. Dra. 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-doutores Joni Augusto Cirelli, José Eduardo Cezar Sampaio, Daniela Leal Zandim-Barcelos e Luis Carlos Spolidório por terem aceitado ser minha banca na qualificação do mestrado e do doutorado, passando conhecimentos, acrescentando idéias e dicas para melhorar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Periodontia Claudinha, Isa, Su, Pri, Luana, Leandro, dona Maria pelo auxílio nos laboratórios, nos procedimentos e análises das peças, nos vários momentos de descontração, apoio em várias fases da minha vida, quebra-galhos, nas altas conversas e confissões, organizando materiais, agenda e dando sentido em toda minha correria no dia a dia. Graças a essas pessoas que meus dias se fizeram, melhores e menos tensas. Amizades como a de vocês que vou levar para a vida toda. Fundamental em todos esses anos.

Aos amigos-parceiros de pós-graduação, em especial Sâmara, Paulinha, Fer Florian, Kahena, Mari, Vinis, Laures, Cris Presoto e Bia Panariello por todo companheirismo, troca de ideias e experiências, desesperos, aflições, chás e cafés, variados estágio docência, aulas, apresentações, congressos enfim por todo o caminho da minha vida e da carreira acadêmica. Obrigada pela existência de vocês!

Aos meus familiares e amigos de Araraquara, Jundiaí, Guaratinguetá, São Paulo em presença e distantes que me apoiarão e apoiam a todo o momento, dando força, incentivo e carinho em pensamento, acreditando junto comigo em mais uma grande realização de um sonho, uma grande conquista.

***"Não tenha medo da mudança. Coisas boas se vão para que outras
melhores possam vir"***
Caio Fernando Abreu

Tsurumaki JN. Avaliação do efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja na periodontite experimental em ratos com artrite induzida. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja (ASU) sobre a doença periodontal experimental em ratos com artrite induzida por antígenos. A artrite foi induzida através da imunização (duas aplicações subcutâneas - 500µg de mBSA) e dois desafios intra-articulares do antígeno albumina de soro bovino metilada (10µg/cavidade articular - mBSA). No estudo 1 os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de acordo com a condição sistêmica: CTR (controle- solução salina), ART (artrite-solução salina), ART/ASU. No dia da remoção das ligaduras os animais receberam a administração do ASU e da solução salina de forma diária por gavagem até o dia da eutanásia dos animais, que ocorreu nos períodos de 7, 15 e 30 dias após a remoção das ligaduras (n=5 animais/grupo). No estudo 2, os animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos de acordo com o tipo de tratamento e a condição sistêmica dos animais: CTR: Animais saudáveis em que foi administrado solução salina; ASU: Animais sem artrite em que foram administrados o ASU; ART/ASU: Animais com artrite induzida em que foi administrado o ASU; ART: Animais com artrite induzida em que foi administrado o solução salina. A periodontite e a artrite foram induzidas da mesma forma que no estudo 1. A periodontite foi tratada no dia da remoção das ligaduras por meio da raspagem com instrumentos manuais. A solução salina e o ASU foram administrados diariamente por gavagem até a eutanásia dos animais que ocorreu nos períodos de 7, 15 e 30 dias após o procedimento de raspagem (n=5 animais/grupo). Em ambos os estudos foram realizados a quantificação da reabsorção óssea pela análise microtomográfica, a análise da composição do infiltrado inflamatório por esterometria dos cortes histológicos e a quantificação da expressão das proteínas fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e receptor ativador do fator nuclear κB/ligante (RANKL) por imunohistoquímica. No estudo 1 foi verificado que o grupo ART/ASU e CTR apresentaram menores reabsorções ósseas, maiores quantidades de fibroblastos e menores quantidades de células inflamatórias que o grupo ART (7 dias). Além disso, o grupo CTR apresentou menores números de células TRAP positivas e o grupo ART/ASU menor expressão de RANKL que o

grupo ART (7 dias). No estudo 2, O grupo ART apresentou maiores reabsorções ósseas, menores quantidades de fibroblastos e maiores quantidades de células inflamatórias do que todos os outros grupos. Adicionalmente, o grupo ART apresentou maior expressão de TRAP e de RANKL em relação aos grupos de animais saudáveis. O uso da ASU reduziu a reabsorção óssea e o processo inflamatório associado a periodontite induzida por ligaduras e melhorou o padrão de cicatrização após tratamento da periodontite experimental especialmente nos animais submetidos à indução de artrite.

Palavras-chave: Regeneração. Inflamação. Periodontite.

Tsurumaki JN. Effect of the avocado/soybean unsaponifiables on the experimental periodontitis in rats with induced arthritis. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on experimental periodontal disease in rats with antigen - induced arthritis. Arthritis was induced by immunization (two subcutaneous applications - 500 µg mBSA) and two intra-articular challenges with methylated bovine serum albumin antigen (10 µg / joint cavity - mBSA). In study 1, the animals were randomly assigned to 3 groups according to the systemic condition: CTR (control-saline solution), ART (arthritis-saline solution), ART / ASU. At the day of the ligature removal, the ASU and saline were administrated daily by gavage until the euthanasia day of the animals, which occurred at 7, 15 and 30 days after ligature removal (n = 5 animals / group). In the study 2, the animals were randomly distributed into 4 groups according to the type of treatment and the systemic condition of the animals: CTR: Healthy animals in which saline was administered; ASU: Healthy animals in which the ASU was administered; ART / ASU: Animals with induced arthritis in which ASU was administered; ART: Animals with induced arthritis in which saline solution was administered. Periodontitis and arthritis were induced in the same manner as in study 1. Periodontitis was treated on the day of ligature removal by scaling with hand instruments. Saline and ASU were administered daily by gavage until euthanasia of the animals occurred at 7, 15 and 30 days after the scraping procedure (n = 5 animals / group). In both studies, the quantification of bone resorption by microtomographic analysis, the analysis of the composition of the inflammatory infiltrate by stereometry of the histological sections and the quantification of the expression of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) proteins and nuclear factor activating receptor κB / ligand (RANKL) by immunohistochemistry was performed. In the study 1, the ART / ASU and CTR groups showed lower bone resorptions, larger amounts of fibroblasts and smaller amounts of inflammatory cells than the ART group (7 days). In addition, the CTR group had lower numbers of TRAP positive cells and the ART / ASU group had a lower RANKL expression than the ART group (7 days). In the study 2, the ART group had higher bone resorptions, smaller amounts of fibroblasts and larger amounts of

inflammatory cells than all the other groups. In addition, the ART group presented greater expression of TRAP and RANKL in relation to the groups of healthy animals. The use of ASU reduced bone resorption and the inflammatory process associated with ligature-induced periodontitis and improved the healing pattern after treatment of experimental periodontitis especially in animals submitted to arthritis induction.

Key-Words: Regeneration. Inflammation. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3 PROPOSIÇÃO.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5 RESULTADOS.....	52
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença crônica, infecciosa, que é induzida pelo desequilíbrio entre a microbiota do biofilme oral e a resposta do hospedeiro, afetando os tecidos de suporte em torno dos dentes²⁴. Ela está associada com diferentes espécies de bactérias, principalmente anaeróbias gram-negativas que estão envolvidas na perda progressiva de suporte alveolar⁴⁰. A resposta do hospedeiro possui um papel fundamental na patogênese da DP, pois os danos teciduais ocorrem através da produção exarcebada da resposta inflamatória a partir da ativação de células do sistema imunológico^{52,54}. Neste processo encontram-se envolvidos mediadores inflamatórios, tais como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2), que são produzidos por fibroblastos, monócitos e macrófagos ativados nos sítios doentes e que podem resultar na osteoclastogênese^{19,24,52}.

Já a artrite (ART) 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^{5,17,38}. Essa patologia tem como sítio de predileção as articulações sinoviais e tem como principais características alterações na cartilagem articular, reabsorção óssea e indução de inflamação com fibrose de ligamentos, tendões, meniscos e cápsulas articulares. Todas as articulações podem ser afetadas, mas as mais comumente envolvidas são os joelhos, as mãos e os quadris¹⁶. Suas ações degenerativas estão ligadas a diversos eventos bioquímicos incluindo alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α que estimulam a degradação da matriz da cartilagem como também pela redução da produção de colágeno tipo II e

proteoglicanos^{4,10}. Também está relacionada com a violação da auto-tolerância e destruição de tecido ósseo articular mediante a presença intensa dessas citocinas pró-inflamatórias que estão ativas no sinóvio articular^{8,36,38}. 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 resultando nos danos teciduais⁶.

A periodontite e a ART compartilham semelhantes mecanismos de destruição óssea e alguns fatores de risco já que ambas as doenças apresentam um componente inflamatório crônico que ativam o sistema imunológico do hospedeiro, na qual a evolução e degradação óssea de ambas as doenças ocorre pelo desequilíbrio da resposta do hospedeiro^{5,12,52,54}. Estudos realizados para confirmar a associação entre a DP e a ART relatam que pacientes com ART possuem uma maior probabilidade de desenvolver DP, aumentando seus índices de severidade, como perda de inserção, placa visível, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e níveis mais elevados de inflamação periodontal comparados a indivíduos saudáveis^{41,42,52,54}.

Baseado na teoria de modulação do hospedeiro é possível utilizar medicamentos imunomoduladores como adjuntos a raspagem e alisamento radicular (RAR), que é considerada padrão ouro para o tratamento da periodontite³⁰. Dentre os medicamentos propostos para o tratamento periodontal os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) seletivos⁵⁸ ou não seletivos para a ciclooxigenase-2 (COX-2)⁵⁷, bifosfonatos³⁴ e as doxiciclinas²⁰, já foram testados e apresentaram resultados animadores. Entretanto, os moduladores da resposta do hospedeiro têm

demonstrado apenas atuar no bloqueio da reabsorção óssea e têm demonstrado induzir efeitos colaterais (eg. Problemas gastrointestinais; osteonecrose) o que tem desencorajado o seu uso no tratamento periodontal^{16,29}.

Como a ART e a DP compartilham mecanismos de destruição de tecido ósseo, os agentes anti-artríticos podem ser boas opções para o tratamento adjunto das periodontites. Entretanto, a maioria dos agentes tradicionalmente utilizados para o tratamento da ART não são curativos e não conseguem reverter o processo de degradação, amenizando apenas os sintomas clínicos, dor e a qualidade de vida¹⁶. Como alternativa a esses medicamentos, tem sido proposta a utilização do extrato de óleo insaponificável de abacate (*Persea gratissima*) e soja (*Glycine max*) – ASU (ANEXO A), cujo um dos seus principais componentes são os fitoesteróis, substância que possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas²⁵, estimula a síntese de colágeno e agrecan e inibe a expressão de citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8, TNF α e PGE2^{9,25,26}. Recentemente, foi demonstrado em estudos pré-clínicos que a aplicação do ASU promove redução da destruição óssea em modelos de periodontite experimental⁴⁵, e o aumento na osseointegração na tíbia de animais saudáveis¹⁸ e com artrite induzida⁴⁸, e que esses efeitos foram associados a redução da expressão de marcadores de destruição óssea^{45,46} e aumento da expressão de marcadores de formação de tecido ósseo^{18,45,46}.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja – ASU sobre a doença periodontal experimental em ratos com artrite induzida por antígenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Relação entre doença periodontal e artrite

A doença periodontal (DP) e a artrite (ART) são doenças inflamatórias crônicas caracterizadas por desregulação da resposta imuno- inflamatória do hospedeiro que compartilham de fatores de riscos e mecanismos patogênicos semelhantes (Smit et al.⁵⁵, 2011; Calderaro et al.¹², 2016). Este desequilíbrio inflamatório é responsável pela maior parte dos danos teciduais e sua gravidade aumenta de acordo com o grau de susceptibilidade do hospedeiro (Garlet et al.²², 2006; Sacre et al.⁵³, 2007; Äyräväinen et al.⁵, 2017).

Alguns estudos estabeleceram a associação entre ART e a DP (Mercado et al.⁴¹, 2001; Liao et al.³⁶, 2009; Mirrieles et al.⁴², 2010; Orendick et al.⁴³, 2009; Smit et al.⁵⁵, 2011). Os pacientes com ART têm maior probabilidade a desenvolver 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 (Potempa et al.⁵², 2017; Silvestre-Rangil et al.⁵⁴, 2017; Calderaro et al.¹², 2016; Äyräväinen et al.⁵, 2017; Bartold et al.⁷, 2005; Mercado et al.⁴¹, 2001; Pischon et al.⁵¹, 2008). A perda de inserção foi maior em indivíduos com ART do que em indivíduos sem ART, indicando que a DP pode ser mais grave na presença da ART (Calderaro et al.¹², 2016).

Mercado et al.⁴¹, em 2001, estudaram indivíduos com ART e determinaram a extensão da DP e a possível correlação entre ambas as doenças. Os autores avaliaram sessenta e cinco pacientes quanto aos níveis de DP e ART comparadas a

um grupo controle sem ART. As medidas avaliadas para ART foram: análise da junção flexível, edema articular, nível de inflamação, índice de dor, avaliação geral de saúde, níveis de proteína C reativa e eritrócitos sedimentados. Os parâmetros avaliados para DP foram: nível clínico de inserção, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, placa visível, nível ósseo avaliado por radiografia. Foi verificado que o grupo apresentou maior profundidade de sondagem e dentes ausentes comparados ao grupo controle. A porcentagem de perda óssea comparada com as medidas avaliadas para a ART foram os principais parâmetros que comprovavam essa associação. Os autores concluíram que as evidências apresentadas foram significativas para a associação da ART e DP, podendo essa associação ser o reflexo da desregulação da resposta do hospedeiro de ambas as doenças.

Al- Katma et al.¹ (2007) avaliaram pacientes com DP crônica e se a eliminação da infecção periodontal e da inflamação gengival teriam alguma influência sobre a gravidade da ART. Vinte e nove pacientes com DP leve a moderada e ART com pelo menos 3 anos de duração foram avaliados durante 8 semanas. Destes pacientes, dezessete receberam tratamento periodontal não cirúrgico e instruções de higiene oral e 12 não receberam tratamento algum. A ART foi avaliada usando o teste de pontuação da atividade da doença (DAS28). Não houve alterações na terapêutica dos pacientes em todo o período avaliado. Dez pacientes tratados e 2 pacientes não tratados apresentaram melhoras nos escores de ART sendo que houve diferenças significativas nos resultados do DAS28 entre o grupo tratado e o controle. Comprovando que o controle da infecção gengival e inflamação periodontal por tratamento não cirúrgico pode reduzir a gravidade da ART.

Pischon et al.⁵¹ (2008) avaliaram até que ponto a falta de higiene oral influenciaria na associação entre a DP e ART, já que para esses autores as confirmações dessa associação estariam ainda inconsistentes. Foram examinados 57 indivíduos com ART e 52 saudáveis, que passaram por avaliações periodontais que incluiu índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção (NCI) e avaliações de saúde geral, combinada com potenciais fatores de risco para a DP e para a ART como indivíduos com diabetes, fumantes, alcoólatras bem como portadores de doenças crônicas que foram avaliados através de questionários. Apenas o grau de severidade e a idade na ART que continuaram sendo resultados significativos como preditores para a DP. Indivíduos com a ART tiveram oito vezes mais probabilidade de ter DP em comparação aos indivíduos saudáveis e o IP e IG combinados, representaram 13,4% da associação entre ART e periodontite, sugerindo que a má higienização oral possa estar parcialmente associada a esses resultados e que outros parâmetros possam estar entre os mediadores responsáveis pelo aumento da prevalência de DP em indivíduos com ART. Os autores concluíram que indivíduos com ART aumentaram significativamente os índices periodontais avaliados e que a higiene oral possa ser parcialmente responsável por essa associação entre as doenças.

Pinho et al.⁴⁹ (2009) estudaram a associação da DP e da ART. Utilizaram de 75 pacientes que foram distribuídos em 5 grupos de acordo com suas condições sistêmicas e tratamentos: grupo 1 – pacientes com DP + ART + tratamento não cirúrgico para DP, grupo 2 - pacientes com DP + ART + sem tratamento periodontal, grupo 3 – pacientes com ART com prótese total, grupo 4 – pacientes com DP sem ART avaliados antes e após o tratamento não cirúrgico da DP e grupo 5 – pacientes considerados saudáveis sem DP/ART. As avaliações clínicas e laboratoriais foram

comparadas entre os períodos inicial, 3 meses e 6 meses, na qual se verificou para a DP, a profundidade de sondagem (PS), sangramento a sondagem (SS), índice de placa (IP), anamnese (HAQ), perfil de escala para saúde funcional e bem estar (SF36) e para a ART, a pontuação de atividade da doença (DAS28), fator reumatoide (RF), glicoproteína (AGG), taxa de eritrócito (ESR) e proteína C-reativa (CRP). Houve diferenças significativas da DP após os 3 meses e após os 6 meses principalmente no grupo 1 e 2 com redução de BOP após 6 meses, redução de PI e BOP após 3 meses. Para DAS28, diferenças significativas nos grupos 1 e 3 nos períodos iniciais e nos 3 meses. Não ficou claro a associação entre a DP e a ART, porém o tratamento não cirúrgico promoveu uma melhora dos índices de DP.

Ortiz et al.⁴⁷ (2009) avaliaram o efeito da realização do tratamento não cirúrgico na DP nos sinais e sintomas de pacientes com ART, tratados com ou sem o anti-fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α) e o efeito sobre este medicamento na DP também foi avaliado. Quarenta pacientes sob tratamento de ART e com DP severa foram avaliados por 6 meses, sendo distribuídos em dois grupos: pacientes que receberam terapia periodontal e instruções de higiene e o grupo com pacientes sem terapia periodontal. Todos os pacientes recebiam tratamento com medicamentos anti-reumáticos (DMARDs) e 20 pacientes destes também usavam o anti-TNF- α . Profundidade de sondagem (PS), perda de inserção (NCI), sangramento a sondagem (SS), índice gengival (IG), índice de placa (IP), índice de atividade de doença (DAS28), taxa de eritrócitos (ESR) foram avaliados. Os pacientes que receberam a terapia periodontal apresentaram redução nos índices de DAS28, ESR e TNF- α , entretanto não houve resultados significativos para o grupo que não recebeu a terapia periodontal. A terapia anti-TNF- α demonstrou melhorar os parâmetros CAL, PS, BOP e GI. A terapia periodontal obteve efeito benéfico nos

sinais e sintomas da ART, independente do uso dos medicamentos para tratar essa condição sistêmica.

Mirrielees et al.⁴² (2010) avaliaram a hipótese de que a ART influencia nos níveis de biomarcadores salivares da DP. Esta hipótese surgiu porque a saliva contém mediadores de inflamação e de degradação do colágeno que são elevadas no soro de pessoas com artrite reumatóide. Cento e cinco pacientes passaram por avaliação médica, avaliação periodontal, análise do nível de dor e foram alocados em 3 grupos de acordo com a sua condição sistêmica e local: CTR (controle-saudáveis), ART e DP. As amostras de saliva não estimulada foram coletadas e analisados os níveis de Interleucina-1 β (IL-1 β), metaloproteinase-8 de matriz (MMP-8) e de fator de necrose tumoral α (TNF- α). Foi observado que o grupo ART apresentou maior quantidade de sítios sangrantes na sondagem (SS) do que os controles correspondentes. Os níveis de MMP-8 e IL-1 β foram maiores no grupo DP e o único biomarcador salivar que obteve um aumento significativo na ART foi a IL-1 β em comparação ao grupo CTR. Os autores concluíram que os biomarcadores salivares são altamente influenciados pela condição da doença periodontal e pela inflamação sistêmica resultante da artrite. Além disso, os indivíduos com ART possuíam níveis mais elevados de inflamação periodontal comparados a indivíduos saudáveis, levando em consideração os resultados de SS avaliados nos pacientes com ART.

Smit et al.⁵⁵ (2011) realizaram uma revisão sistemática agrupando possíveis interações que poderiam explicar a associação entre a DP e ART. Citando que ambas são doenças inflamatórias destrutivas crônicas, caracterizadas pela desregulação da resposta inflamatória do hospedeiro e a suscetibilidade de ambas as doenças são influenciadas por fatores genéticos e do estilo de vida. São doenças cumulativas, isto é, a gravidade, a perda de função e a qualidade de vida diminuem

com o aumento do tempo da presença da doença no indivíduo. A partir de evidências epidemiológicas verificadas nesta revisão, quatro questões precisaram ser abordadas: força, consistência, relação temporal e analogia. O terceiro exame nacional de saúde e nutrição (NHANES III) é uma seção transversal representativa nacional que promove o levantamento da população não institucionalizada dos EUA, que foi utilizado como parâmetro entre os artigos usados nesta revisão, para verificar e classificar os índices de ART na qual incluem indivíduos com idade aproximada de 60 anos, submetidos a exames músculo-esqueléticos e dentários. Concluíram que os indivíduos que foram classificados como portadores de ART possuíam maior propensão a apresentarem DP.

Okada et al.⁴⁴ (2013) avaliaram se o tratamento periodontal pode afetar a secreção de anticorpos séricos contra os níveis de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a atividade da ART. Vinte e seis pacientes com ART receberam tratamento periodontal não cirúrgico e instruções de higiene oral e vinte e nove pacientes com ART não receberam nenhum tratamento periodontal. Os índices periodontais, reumatológicos e níveis séricos de citocinas, citrulina e imunoglobulina G (IgG) a Pg foram realizados. O grupo em tratamento apresentou redução significativas de DAS28, IgG e citrulina comparadas ao grupo controle. Os níveis séricos de IgG a Pg foram correlacionados positivamente para os anticorpos citrulados anticíclicos e para os fatores reumatóides, o que sugere que o tratamento periodontal reduz os índices de DAS28 , IgG, Pg e citrulina em pacientes com ART pois a presença de Pg está relacionada a patogênese ART.

Calderaro et al.¹² (2016), através de uma revisão sistemática e meta-análise avaliaram a influência do tratamento da DP sobre a ART. Foram incluídos quatro artigos de estudos prospectivos (Al-Katma et al.¹, 2007, Pinho et al.⁴⁹, 2009, Ortiz et

al.⁴⁷, 2009; Okada et al.⁴⁴, 2013) , com indivíduos com idade superior a 18 anos, diagnosticados com ART e DP, submetidos a tratamento periodontal não cirúrgico e instruções de higiene oral comparados ao grupo controle, composto por indivíduos que não passaram por nenhum tipo de tratamento periodontal nem receberam instruções de higiene oral. Os artigos mostraram que o tratamento periodontal não cirúrgico reduziu discretamente, mas significativamente, a gravidade da ART, reduzindo as taxas de eritrócitos, proteína C reativa e inflamação, trazendo assim efeito benéfico sobre a atividade da ART.

Silvestre-Rangil et al.⁵⁴ (2017), estudaram os níveis salivares de interleucina 6 (IL-6) em pacientes com ART comparadas ao grupo controle e a possível relação da condição oral e a gravidade da ART. Trinta pacientes saudáveis e 30 pacientes com ART participaram deste estudo, na qual foram feitos periogramas completos e a mensuração dos níveis salivares de IL-6 em saliva em repouso, saliva estimulada e fluxo parotídeo estimulado. Pacientes com ART apresentaram maiores índices de placa, perda de inserção, bolsas maiores de 5 mm, profundidade de sondagem e maior perda de inserção comparada ao grupo controle. Em relação a expressão de IL-6, foi verificado um aumento dessa citocina associado a uma redução do fluxo salivar. Os autores desse estudo concluíram que pacientes com ART possuem maiores tendências de desenvolver doença periodontal associado a redução do fluxo salivar e aumento dos níveis salivares de IL-6.

Äyräväinen et al.⁵ (2017) investigaram a associação da DP e da ART com ênfase no efeito dos fármacos utilizados no tratamento da ART sobre a saúde periodontal. Esse estudo prospectivo de 16 meses contou com a participação de 124 pacientes com ART precoce (ERA) ou ART crônica (CRA), que passaram por avaliação periodontal e reumática, na qual 53 pacientes que faziam o tratamento

para a ART, com fármacos anti-reumáticos (DMARDS) e obtinham a eficácia esperada, estando satisfeitos com os resultados obtidos, 28 pacientes que faziam o tratamento com DMARDS porém insatisfeitos com os resultados obtidos desses medicamentos e 43 pacientes que não utilizavam nenhum tipo de medicamento (CTR). Foram avaliados o grau de periodontite, prevalência de bactérias periodontais, estado reumatológico (DAS28), anamnese completa e resposta ao tratamento por critérios da Liga Européia Contra Reumatismo (EULAR). A DP esteve presente em 67,3% dos pacientes com ERA, 64,3% pacientes com CRA e 39,5% dos pacientes CTR. A ART demonstrou resultados piores em relação aos índices avaliados no exame periodontal comparado ao grupo CTR, mesmo utilizando DMARDS durante o período experimental. A prevalência de *Porphyromonas gingivalis* foi maior em pacientes com ERA do que em pacientes CRA e CTR. Os autores encontraram resultados mais deficientes nos índices periodontais nos pacientes com ERA e CRA comparadas ao grupo CTR e não houve associação significativa entre o tratamento com os fármacos anti-reumáticos e os índices periodontais.

Uso do ASU para o tratamento da ART

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.³¹, 2006). Altos níveis de IL-17 tem sido detectados no fluido sinovial de pacientes com artrite (Chabaud et al.¹⁴, 1999; Kotake et al.³², 1999) bem como no fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal (Takahashi et al.⁵⁶, 2005; Johnson et al.²⁸, 2004). A IL-1 induz níveis elevados de COX₂ e Prostaglandina E2 (PGE₂), o que pode explicar a dor associada com a degeneração

da ART (Christiansen et al.¹⁶, 2015). Medicamentos para o tratamento da ART tem normalmente como foco o bloqueio das citocinas pró-inflamatórias que também pode ser útil para o tratamento das periodontites.

Dentre esses medicamentos que já foram propostos no tratamento adjunto a doença periodontal, destaca-se o uso dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os corticosteróides, entretanto, o uso prolongado desses medicamentos estão relacionados a efeitos colaterais tais como lesões gastrointestinais, toxicidade e disfunção hepática (Kantarci et al.²⁹, 2006; Christiansen et al.¹⁶, 2015; Boileau et al.⁹, 2009).

Atualmente, encontra-se no mercado o extrato de óleo insaponificável de abacate (*Persea gratissima*) e soja (*Glycine max*) - ASU, que é derivado do fruto e das sementes dessas plantas, composta por um terço de óleo abacate e dois terços de óleo insaponificável de soja (A1SU2), considerado um fitoterápico. Esse medicamento possui ação lenta e é um potente anti-inflamatório, agente antioxidante e analgésico, com efeito prolongado e é eficaz no controle dos sintomas, principalmente a dor e tem um excelente histórico de segurança, não possui efeito colateral (Herontin et al.²⁶, 2003; Lippiello et al.³⁷, 2008; Christiansen et al.¹⁶, 2015). Os fitoesteróis são os principais componentes da ASU e essas substâncias têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Goudarzi et al.²⁵, 2017). Alguns estudos descrevem a utilização do ASU no tratamento da ART em estudos in vitro, pré-clínicos e clínicos.

Boumediene et al.¹⁰ (1999), realizaram um estudo in vitro para determinar o mecanismo de ação da ASU em condrócitos articulares, com a hipótese de que o uso do ASU estimularia a deposição e reparação da matriz extracelular o que confirmaria

os benefícios sobre o tratamento da osteoartrite. Condrócitos articulares bovinos foram cultivados e tratados em 10 µg/mL de ASU e a expressão de TGF-β 1 e 2 e seus respectivos receptores TGF-βRI e TGF-βRII foram avaliados através de transcriptase reversa – PCR e ELISA. Os resultados indicaram que a ASU estimula a expressão de TGF-β 1 e 2 em condrocitos articulares, sendo que, em contraste, não obteve efeito significativo em seus receptores. Esses resultados indicaram que o ASU pode induzir a estimulação da síntese da matriz sugerindo que a utilização de ASU pode promover a reparação de mecanismos da matriz na cartilagem articular.

Cake et al.¹¹ (2000), examinaram o efeito do ASU sobre o desenvolvimento de patologia articular em um modelo ovino de osteoartrite (OA). Trinta e dois animais foram utilizados, sendo que a metade desses animais que receberam a indução OA nas articulações do joelho por meniscectomia lateral bilateral (N = 16) receberam 900 mg de ASU por dia (MenX + ASU) e a outra metade dos animais foram considerados controle por receber o tratamento com um placebo (MenX). Aos 3 e 6 meses pós-meniscectomia, foram preparadas secções histológicas dos côndilos medulares e laterais do fêmur (MFC, LFC), platôs tibiais (MTP, LTP) e sulco troquelar (TG) de todas as articulações. Foram avaliadas usando escalas histopatológicas tradicionais e análise de imagem computadorizada, medindo a área total de cartilagem não-calcificada (UCC), espessura da placa de osso subcondral (SCP) e intensidade da coloração do azul de toluidina da cartilagem articular e aplicação de um índice de conteúdo de proteoglicano (PG). Os animais tratados com ASU, aos 6 meses mostraram redução de mancha de azul de toluidina no MTP e no LTP e coloração significativamente maior no TG comparados ao grupo placebo. A espessura de UCC aumentou após a indução, mas tendenciou a ser mais alta nos

animais tratados com ASU. O tratamento com ASU após meniscectomia apresentou um efeito protetor sutil, mas estatisticamente significativo na cartilagem articular.

Appelboom et al.³ (2001), compararam os efeitos de diferentes doses de ASU em pacientes com osteoartrite no joelho. Foram avaliadas a ingestão diária de 300 mg e 600 mg de ASU ou placebo, por 3 meses em 260 pacientes, de ambos os sexos com idade entre 45 e 80 anos apresentando osteoartrite no joelho. A avaliação clínica foi realizada em 4 tempos (Dia 0, Dia 30, Dia 60 e Dia 90) aonde foi avaliado a redução do uso de anti-inflamatórios não estereoidais (AINES) e analgésicos. Todos os parâmetros analisados obtiveram melhoras significativas em relação ao grupo placebo. No dia 90, houve redução de 50% no uso de AINES e 71% no uso de analgésicos em pacientes que utilizaram ASU. Não houve diferença significativa na utilização das duas dosagens. Os autores concluíram que, independente da concentração utilizada, o uso do ASU demonstrou melhoras significativas em comparação ao grupo placebo no tratamento da OA.

Lequesne et al.³⁵ (2002), estudaram os efeitos estruturais da utilização do ASU no tratamento de pacientes com osteoartrite (OA) do quadril. Foram incluídos neste estudo 163 pacientes, sendo 102 homens e 61 mulheres, com OA do quadril confirmados, sendo avaliados radiologicamente, usando como critério espaço articular $>$ ou $=$ 1 mm (Kellgren grau 1 a 3). Estes pacientes foram distribuídos em dois grupos: controle (placebo) e o ASU, avaliados por um período de dois anos. O critério de avaliação primária foi a diminuição da largura do espaço articular (JSW) e os critérios secundários foram medidas de resultados clínicos padrão (dor em escala analógica visual, consumo de drogas anti-inflamatórias não esteróides e avaliações globais do paciente e do investigador). Os pacientes foram divididos em 2 subgrupos de acordo com o valor médio da JSW inicial (2.45 mm). A perda de espaço articular

no subgrupo mais severamente afetado dos pacientes (JSW basal = mediana) foi significativamente maior no grupo placebo do que no grupo ASU e os parâmetros clínicos nos 2 grupos não obtiveram resultados significativos durante o período avaliado. Este estudo piloto randomizado, duplo-cego e controlado por placebo não demonstrou um efeito estrutural da ASU na OA do quadril. Sugerindo que a ASU possa ter um efeito estrutural, mas requer estudos mais aprofundados.

Herontin et al.²⁶ (2003), avaliaram a eficácia da utilização do ASU sobre o metabolismo de condrócitos osteoartríticos humanos (OA), isolados enzimaticamente e cultivados em alginatos por 12 dias. Os condrócitos foram cultivados na presença ou não de interleucina (IL-1 β), com ou sem a presença do ASU, que variou nas concentrações de 0,625 a 0,40 $\mu\text{g/mL}$. A produção de aggrecan (AGG), estromelisina-1 (MMP-3), inibidor de metaloproteinases-1 (TIMP-1), proteína inflamatória de macrófagos-1beta (MIP-1beta), IL-6 e IL-8, PGE2 foram mensurados por Elisa. A aplicação do ASU apresentou resultados positivos, aumentando a síntese e acúmulo de AGG, inibição da produção de MMP-3, inibiu a produção basal de IL-6, IL-8, MIP-1 β e PGE2 e neutralizou parcialmente o efeito estimulante da IL-1 β em PGE2. Os resultados desse estudo sugerem que a utilização de ASU agrega efeitos modificadores estruturais em condrócitos derivados de cartilagem de articulações com OA, por inibição da degradação e promoção da reparação da cartilagem.

Herontin et al.²⁷ (2006) avaliaram os efeitos da utilização do ASU sob a desregulação do metabolismo dos condrócitos induzida por osteoblastos. Condrócitos humanos foram isolados da cartilagem de osteoartrite (OA) e cultivados na ausência ou presença de osteoblastos isolados de regiões não escleróticas (NSC) ou regiões escleróticas (SC) das cartilagens articulares. Antes da co-cultura,

os osteoblastos foram incubados com 10 µg/mL de ASU por 72h. Por meio do RT-PCR foram quantificados nos condrócitos, aggrecan, colágeno tipo II, metaloproteinase de matriz – 3 (MMP-3) e MMP-13, inibidor de tecido de metaloproteinase (TIMP-1), fator de crescimento tranformante beta-1 (TGF-1β) e TGF-β3, síntase de NO induzível (iNOS) e os níveis de mRNA de ciclooxigenase-2 (COX-2). A expressão proteica de aggrecan, interleucina 1β (IL-1β), osteocalcina e TGF-1β também foram avaliadas por imunoenaios. Os osteoblastos SC estimularam uma redução na produção de proteína de matriz e um aumento de MMPs, não houve alterações significativas nos níveis de mRNA, TIMP-1, TGF-1β, TGF-3, iNOS e COX-2. No pré tratamento dos osteoblastos no grupo SC que utilizou o ASU apresentou efeitos inibitórios na produção de componentes da matriz e aumentou significativamente o nível de mRNA de colágeno tipo II não modificando os níveis de MMP, TIMP-1, TGF-1β, TGF-3β, iNOS ou COX-2. Baseados nestes resultados, concluíram que a utilização do ASU pode influenciar na reparação da cartilagem com OA atuando sobre os osteoblastos.

Au et al.⁴ (2007), realizaram um estudo para avaliar os efeitos do ASU sobre mediadores pró-inflamatórios em condrócitos e células monócitos/ macrófagos articulares. Condrócitos foram incubados a 5% de CO₂ por 72 h, distribuídos em meios sozinhos ou com concentrações de ASU (0,3, 0,9, 2,7, 8,3 e 25 mg/mL). As células foram ativadas com 20 mg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 24h. PCR em tempo real foi realizado para avaliar o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1β (IL-1β), ciclooxigenase -2 (COX), expressão de oxido nítrico induzível (iNOS) e no sobrenadante foi avaliado presença de prostaglandina E2 (PGE2) e teor de nitrito. Os condrócitos ativados por LPS que estavam na presença de ASU apresentaram supressão de IL-1β, COX-2, TNF-α e iNOS e no sobrenadante celular

houve redução significativa de PGE2 e nitrito. Em monócitos/macrófagos, reduziu a expressão de TNF- α e IL-1 β . Os autores concluíram que o ASU possui ação anti-inflamatória não só se restringindo a condrócitos, mas também afetando monócitos/macrófagos.

Christensen et al.¹⁵ (2008) realizaram uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados que avaliaram a eficácia da utilização do ASU em pacientes com osteoartrite (OA) comparados com grupo placebo. Foram incluídos 4 ensaios, dando um total de 664 pacientes, sendo com 41,4% com OA no quadril e 58,6% no joelho, que estão em tratamentos para OA. Foram administrados 300 mg de ASU em 336 pacientes durante um período de 6 meses. A análise primária avaliada foi a redução da dor e a mensuração do efeito sob os pacientes, avaliado por meio do índice de Lesquene (ES) e para a análise secundária o número de pacientes que responderam positivamente à terapia. Com base em resultados heterogêneos, o grupo que recebeu ASU apresentou melhoras na redução da dor (83,5%), redução no ES (61%) e aumento no número de pacientes que responderam positivamente à terapia. Com base nos resultados, foi sugerido que os pacientes podem associar o ASU aos medicamentos utilizados para tratamento de OA, obtendo melhores resultados em pacientes com OA no joelho.

Boileau et al.⁹ (2009), investigaram o efeito e o modo de ação do ASU sobre o desenvolvimento de lesões osteoartíticas em cães. A osteoartrite foi induzida pelo rompimento do ligamento anterior do joelho de 16 cães que foram distribuídos em 2 grupos: um grupo placebo e o outro com a administração do ASU (10 mg/Kg por dia) durante 8 semanas. Foram realizadas análises macroscópicas, histomorfológicas de cartilagem e osso subcondral dos côndilos femorais e imuno-histoquímica para expressão de óxido nítrico induzível (iNOS), matriz metaloproteinase 1 (MMP-1) e

MMP-13, desintegrina e metaloproteinase de trombospondina (ADAMTS 4 e 5). A gravidade das lesões na cartilagem, lesões macroscópicas na tíbia, infiltração celular sinovial, perda de volume ósseo, espessura de cartilagem calcificada foram diminuídas significativamente com a administração do ASU em comparação ao grupo placebo. Na análise imuno-histoquímica com o uso da ASU houve a redução da expressão de MMP-13 e do óxido nítrico sintase na cartilagem. Esse estudo demonstrou que o tratamento com ASU pode reduzir o desenvolvimento de cartilagem osteoartrítica precoce e lesões subcondrais, sendo resultado da redução de MMP-13 e do óxido nítrico sintase que são mediadores fundamentais dessas mudanças nas estruturas.

Maheu et al.³⁹ (2014), avaliaram a capacidade do ASU no retardamento da progressão das modificações das estruturas na osteoartrite no quadril. Trezentos e quarenta e cinco pacientes foram avaliados pelo conjunto de dados de análise completo (FAS), que incluiu todos os pacientes com pelo menos duas radiografias sucessivas, com índice sintomático (com mais de um ano com sintomas dolorosos e índice de Lequesne entre 3 e 10) e uma largura mínima do espaço articular (JSW) do quadril avaliado entre 1 e 4 mm em uma radiografia pélvica. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: ASU e placebo, sendo que o ASU foi administrado na dosagem de 300 mg/dia pelo período de 3 anos. Foi realizada uma análise de medições para comparar as mudanças de JSW durante o período experimental (resultado primário) e as porcentagens de progressão (perda de JSW \geq 0,5 mm) entre os dois grupos. Não houve diferença significativa na perda média de JSW nos grupos estudados, mas houve 20% menos de progressão nas modificações das articulações no grupo ASU comparado ao grupo placebo e não houve diferença nos resultados clínicos. O período avaliado demonstrou que o ASU reduz a porcentagem

de progressão de JSW, indicando um significativo efeito benéfico de modificação da estrutura no OA do quadril.

Catunda et al.¹³ (2016), investigaram a eficácia do ASU no tratamento de pacientes com osteoartrite e artralgia na articulação temporomandibular (ATM). Quatorze mulheres diagnosticadas com osteoartrite e artralgia na ATM foram avaliadas e distribuídas em dois grupos: ASU e placebo pelo período de 6 meses. A dor foi medida usando uma escala analógica visual e algômetro de pressão. Por meio dos movimentos mandibulares foi avaliado a função mandibular e a qualidade de vida foi medida pelo Perfil de Impacto em Saúde Oral (OHIP-14). As mulheres que utilizaram ASU apresentaram redução nos sintomas da dor, melhoraram a qualidade de vida e reduziram a utilização de medicamentos alternativos ao tratamento de osteoartrite e artralgia comparados ao grupo placebo. Os autores concluíram que existem fortes evidências da eficácia da utilização do ASU no tratamento de doenças degenerativas das articulações e artralgia na ATM.

Gluszko et al.²³ (2016) avaliaram os efeitos do ASU sobre o alívio da dor e da capacidade funcional em pacientes com OA do joelho. Durante seis meses foram estudados 4186 pacientes poloneses com OA do joelho em que foi administrado diariamente 300 mg de ASU como tratamento rotineiro. Os pacientes não tiveram diagnósticos de outras doenças reumáticas e não foram tratados com outros fármacos sintomáticos de ação lenta para OA (SYSADOAs). Os dados sobre os sintomas de OA e a terapia foram coletados após o início do tratamento com ASU (visita 0) e durante 3 visitas de controle realizadas a cada 2 meses (visitas 1-3). O índice funcional de Lequesne, a gravidade da dor nas articulações (índice de Laitinen e VAS), o uso de analgésicos e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), adesão ao tratamento e eventos adversos foram avaliados. Houve uma melhora

significativa na capacidade funcional entre as últimas e as primeiras visitas, evidenciado pelo índice Lequesne, diminuindo de 8 para 4 pontos, redução das medidas de intensidade da dor, e redução na administração de analgésicos e AINEs (diminuiu de 58,8% na visita inicial para 24,9% na última visita 3). Além disso, não foram observados reações adversas associados ao tratamento com ASU. O tratamento com ASU mostrou alívio gradual da dor nas articulações, melhora na capacidade funcional e redução significativa na ingestão de AINEs.

Estudos in vitro e pré-clínicos que avaliaram o efeito do ASU sobre o periodonto e sobre a osseointegração

Devido aos efeitos do ASU no tratamento das OA e artrite, estudos in vitro e pré-clínicos foram conduzidos com o intuito de verificar se o ASU também poderia atuar de forma benéfica sobre o reparo periodontal e na osseointegração.

Kut-Laserre et al.³³ (2001), estudaram o efeito do ASU e de suas frações de abacate (ASF) e de soja (SSF) em fibroblastos gengivais humanos sobre a secreção de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-3) e de seus inibidores (TIMP-1 e TIMP-2). Os fibroblastos foram cultivados por 72h na presença de ASU, ASF ou SSF nas concentrações de 0,1, 0,5, 2,5, 5 e 10 µg/mL de meio de cultura após pré tratamento ou não com interleucina 1β (IL-1β). A MMP-2, MMP-3, TIMP-1 e TIMP-2 foram detectados e quantificados por zimografia. Uma ligeira diminuição na secreção de MMP-2 e MMP-3 foi observada principalmente nas baixas concentrações de ASU, ASF e SSF na ausência de IL-1β. TIMP-1 não obteve resultados significativos e TIMP-2 apresentou uma leve diminuição da secreção nas baixas concentrações de ASU, ASF e SSF e um sutil aumento nas concentrações maiores. ASU, ASF e SSF reverteram a ação da IL-1β nos fibroblastos gengivais para MMP-2 e MMP-3 em

concentrações menores e TIMP-1 em concentrações maiores. Os autores concluíram que a ASU possui um potencial preventivo sobre os efeitos inflamatórios da IL-1 β sobre os fibroblastos gengivais.

Andriamanalijaona et al.² (2006), realizaram um experimento para avaliar o efeito in vitro do ASU na expressão do fator de crescimento beta (TGF- β 1/ TGF- β 2) e a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) em células humanas do ligamento periodontal humano (HPL) e do osso alveolar (HAB) na presença ou não da interleucina 1 β (IL-1 β). As células HPL e HAB foram incubadas por 48 horas com ASU na presença ou não da IL-1 β . Os níveis de TGF-1 β , TGF-2 β e BMP-2 foram avaliados através de Northern Blot e por RT-PCR e a quantidade de proteínas por Elisa. Os resultados indicaram que a IL-1 β diminuiu fortemente a expressão da TGF- β e da BMP-2 por células de HPL, sendo o efeito da ASU capaz de se opor e interferir na ação dessa interleucina. Os autores concluíram que o ASU pode exercer uma função preventiva sobre os efeitos deletérios da IL-1 β .

De Oliveira et al.¹⁸ (2014), avaliaram a influência da administração do ASU na osseointegração na tíbia de rato. Trinta ratos foram submetidos à colocação de um implante de titânio na tíbia e distribuídos aleatoriamente em três grupos: ASU1 (administração de ASU sete dias antes da colocação do implante), ASU2 (administração de ASU no dia da colocação do implante) e CTR (controle – administração de soro). Todos os animais receberam o ASU ou solução salina por meio de gavagem até o sacrifício, que foi realizado 60 dias após a colocação dos implantes. A osseointegração dos implantes e a maturação óssea foram avaliadas por análise biomecânica e radiográfica da densidade óssea, análise histológica, imunohistoquímica para proteína morfogenética óssea (BMP-2), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) e osteocalcina e avaliação histomorfométrica do

contato osso-implante (BIC) e fração da área óssea mineralizada dentro das roscas dos implantes (BBT). Foi observado a presença de uma maior expressão de BMP-2 e TGF- β 1 nos grupos ASU1 e ASU2 em comparação ao grupo CTR. Na análise histomorfométrica, tanto o ASU1 como o ASU2 apresentaram significativamente maiores valores de BIC na região cortical. Os autores concluíram que a utilização do ASU resultou em um sutil efeito sobre a osseointegração de implantes nas tíbias dos ratos.

Oliveira et al.⁴⁵ (2016), avaliaram o efeito da administração de ASU sobre a reparação óssea após indução de doença periodontal por ligaduras em ratos. Foi induzida a doença periodontal por meio da inserção de ligaduras em oitenta e quatro ratos que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: CTR (controle), ASU/-7 (início da administração do ASU sete dias antes da indução da periodontite), ASU/0 (início da administração do ASU no dia da indução da periodontite) e ASU/+7 (início da administração do ASU sete dias após a indução da periodontite). As ligaduras foram mantidas 7 dias em posição e os animais foram avaliados pelo período de 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. Para avaliar a reabsorção óssea foram realizadas análise histomorfométrica e microtomográfica (Micro-CT). A imuno-histoquímica foi utilizada para avaliar a expressão de TRAP, RANKL e fosfatase alcalina (ALP) e os níveis dos genes da interleucina beta 1 (IL- β 1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), RANKL e ALP por qPCR. Na análise histomorfométrica e pelo Micro-CT os resultados demonstraram que houve uma maior reabsorção óssea nos grupos CTR em comparação aos grupos que foram administrados o ASU. Adicionalmente, o grupo CTR apresentou uma maior expressão de TRAP e RANKL comparados aos grupos ASU e o qPCR demonstrou níveis mais elevados de RANKL e IL- β 1 e níveis mais baixos de ALP no grupo CTR .

Os autores desse estudo concluíram que a utilização do ASU trouxe efeito positivo no reparo ósseo após indução da periodontite através de ligaduras em ratos.

Oliveira et al.⁴⁶ (2017), avaliaram o efeito da ASU sobre o tratamento da periodontite induzida em ratos. Oitenta e quatro ratos foram utilizados e distribuídos em 4 grupos: RAR/soro (raspagem+soro), ASU/-7 (Início da administração de ASU sete dias antes da indução da periodontite), ASU/0 (administração iniciada no dia no dia da indução da periodontite) e RAR/ASU+7 (Início da administração do ASU no dia do tratamento de RAR, sete dias após a indução da periodontite). Foram realizadas análise histomorfométrica e microtomográfica (Micro-CT) para avaliar a quantidade de osso ao redor do segundo molar superior, análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão de proteínas (TRAP, RANKL, fosfatase alcalina) e análise da expressão de mRNA (IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL e fosfatase alcalina) por qPCR. O Grupo RAR/ASU+7 apresentou maior porcentagem de preenchimento ósseo na região de furca e maior expressão de fosfatase alcalina comparado ao grupo RAR/soro nos períodos de 7 e 30 dias. Os grupos RAR/ASU0 e RAR/ASU+7 apresentaram menores níveis de expressão de RANKL mRNA do que o grupo RAR/soro e RAR/ASU-7 aos 15 dias. Os autores concluíram que a associação entre RAR e ASU exerceu um sutil efeito no reparo periodontal após tratamento da periodontite experimental.

Paula et al.⁴⁸ (2017), avaliaram a influência do uso do ASU sobre a osseointegração de implantes em ratos com artrite induzida. Cento e vinte ratos receberam através de gavagem doses diárias do ASU, iniciando essa administração 7 dias antes do procedimento cirúrgico de inclusão dos implantes até a conclusão dos períodos experimentais (15, 30 e 60 dias), estes foram distribuídos em quatro grupos: CTR (controle – ratos saudáveis+soro), ASU (ratos saudáveis+ASU), ART

(ratos com artrite induzida+soro) e ART+ASU (ratos com artrite induzida+ASU). Análise histométrica e biomecânica foram realizadas para verificar a osseointegração dos implantes: contato osso-implante (%BIC) e área óssea entre as roscas (%BBT). A microtomografia foi executado para avaliar a quantidade de volume ósseo ao redor dos implantes e a imuno-histoquímica foi executada para a expressão de osteocalcina e TGF- β 1. O grupo ART/ASU apresentou uma diminuição da porcentagem de osso ao redor do implante, valores aumentados de torque de remoção, %BIC e % BBT em comparação com os grupos ASU e ART (15 e 30 dias). O grupo ASU aumentou a %BIC e teve uma maior expressão de TGF- β 1 em comparação ao grupo ART e CTR (60 dias). Os autores concluíram que a administração de ASU teve efeitos positivos na osseointegração principalmente em ratos com artrite induzida.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja – ASU sobre a doença periodontal experimental em ratos com artrite induzida por antígenos.

Proposição Específica

Estudo 1

Avaliar o efeito do ASU sobre o reparo ósseo alveolar em ratos com artrite e periodontite induzida.

Estudo 2

Avaliar o efeito do ASU sobre o tratamento da periodontite por ligadura em ratos com artrite induzida por antígeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos desse estudo será dividido em dois estudos de acordo com os objetivos específicos propostos. O estudo 1 está intitulado como Efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja sobre o reparo ósseo alveolar em ratos com artrite e periodontite induzida, enquanto que o estudo 2 está intitulado como Efeito do uso adjunto do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja no tratamento da periodontite por ligadura em ratos com artrite induzida por antígeno. As seções de divisões de grupos e desenho experimental serão descritas separadamente. As análises serão posteriormente descritas em conjunto.

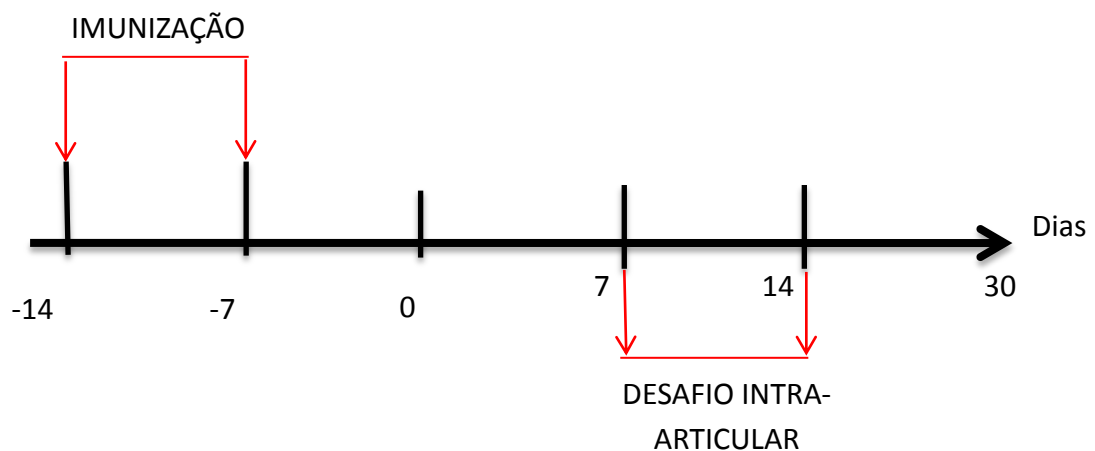
Esse estudo foi submetido e aprovado junto a Comissão de ética de uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CEUA-09/2012 – ANEXO B). Neste estudo foram utilizados 45 ratos machos no estudo 1 e 60 ratos no estudo 2 (*Rattus Norvegicus*), variação albinus, Holtzman, pesando de 300 - 330g, que foram mantidos em um Biotério 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. Todo o estudo foi conduzido de acordo com as normas do guidelines ARRIVE.

Indução da Artrite Experimental e análise da indução da artrite

A indução da artrite experimental ocorreu de forma similar a metodologia executada em estudos anteriores⁵⁰. De forma resumida, foi executado a imunização, por duas aplicações sub-cutâneas de 500 µg de mBSA diluídos em 0,2 mL de

emulsão contendo 0,1 mL de solução salina e 0,1 mL de solução adjuvante de Freund completa, com intervalo de 7 dias (Sigma, St. Louis, MO). O desafio intra-articular foi executado com injeções com o antígeno de mBSA (10 µg/cavidade articular) diluído em 10 µL de PBS na articulação fêmur-tibial da pata traseira direita, 14 dias após a última imunização. Os desafios intra-articulares foram executados duas vezes com intervalos de 7 dias (com exceção dos animais dos períodos de 7 dias, onde esse intervalo foi reduzido para 3 dias). As mesmas intervenções foram executadas nos animais saudáveis, porém as substâncias indutoras da artrite foram substituídas por solução salina (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma dos desafios com o antígeno para indução de ART.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As articulações foram posteriormente analisadas por meio de análise histológica de cortes descalcificados e corados pela técnica da hematoxilina/eosina (HE) para comprovação do sucesso da indução da artrite, onde foram identificadas alterações da espessura sinovial, presença de infiltrado inflamatório anormal e de

erosão da cartilagem/osso em comparação as articulações dos grupos de animais saudáveis.

Indução da Doença Periodontal

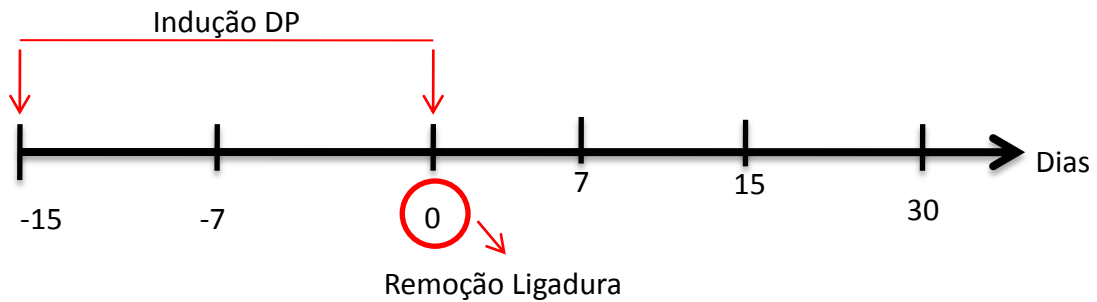
Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 mL/100 g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina) e 0,04 mL/100 g massa corporal (Cloridrato de Xilazina). Posteriormente, foram inseridas ligaduras (fios de algodão, n^o24) na região subgingival, em volta dos segundos molares superiores (Figura 2). Após um período de quinze dias, as ligaduras foram removidas e os medicamentos começaram a ser administrados aos animais (Figura 3).

Figura 2 – Colocação das ligaduras no segundo molar superior.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 3 - Fluxograma do experimento de indução da periodontite experimental.

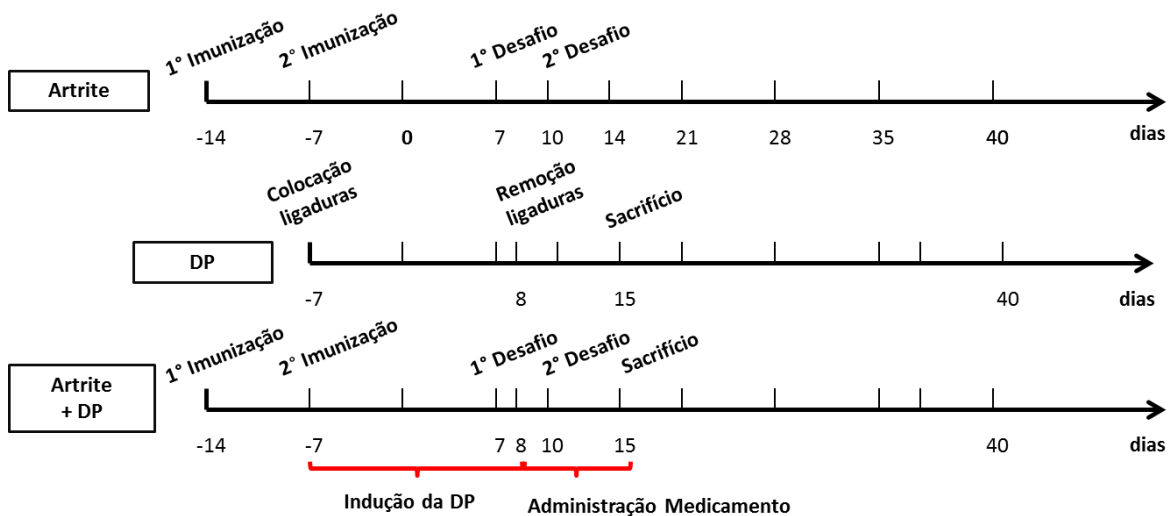


Fonte: Elaborado pelo autor.

Delineamento Experimental

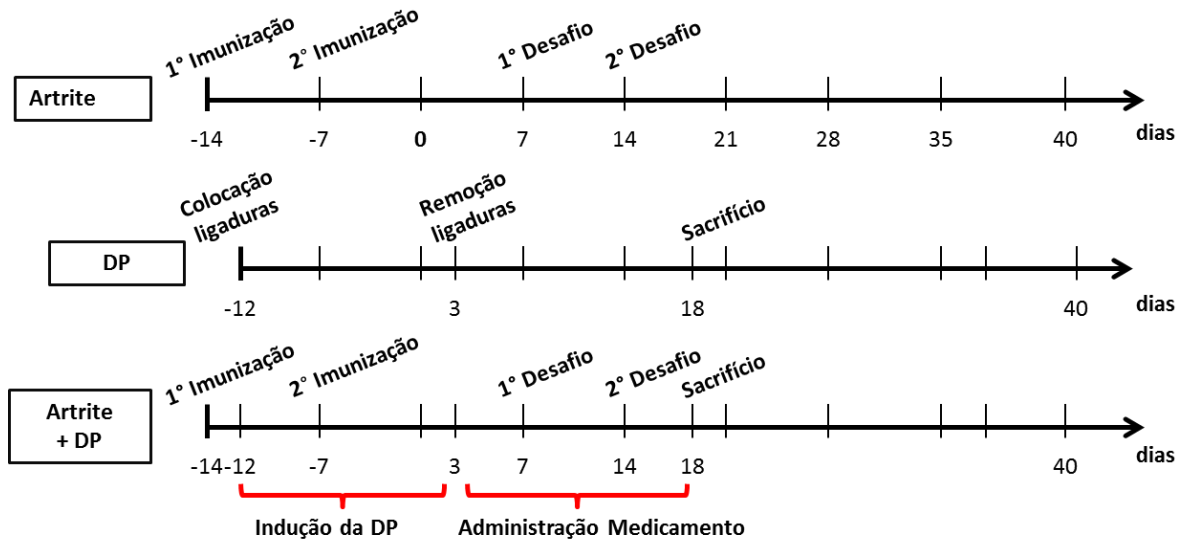
A indução da artrite experimental (imunização e desafio) e da doença periodontal foram realizadas de acordo com o período final de cada grupo (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4 - Período Experimental 7 dias.



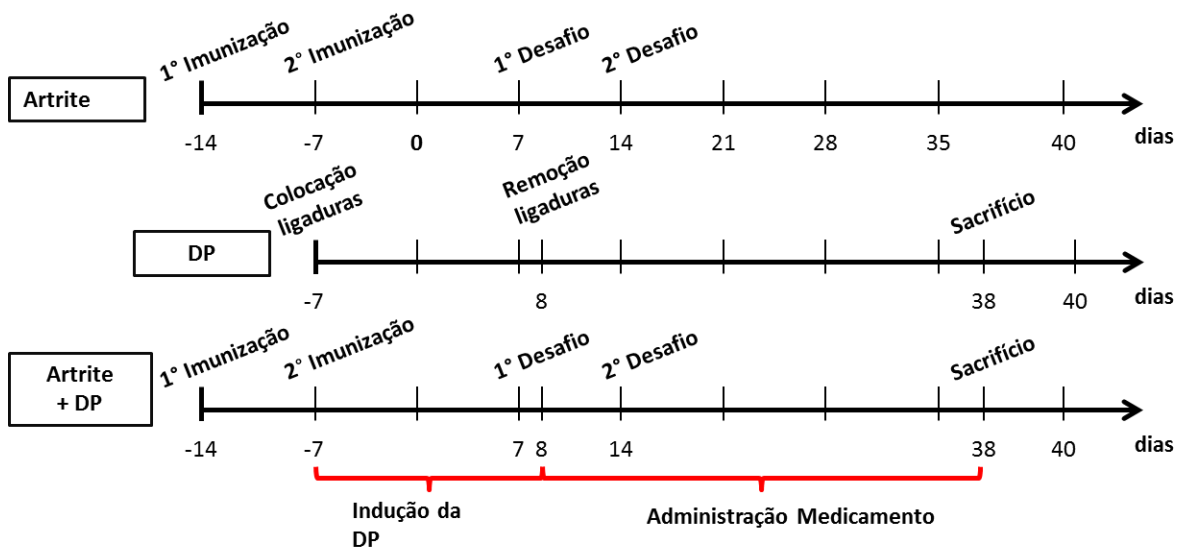
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Período Experimental 15 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Período Experimental 30 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Obtenção das amostras

Após os períodos correspondentes os animais foram sacrificados por sobredosagem de anestésicos. Logo após, as maxilas e os joelhos de cada animal foram removidos e fixados em paraformaldeído a 4% por um período de 24 horas.

Avaliação da Artrite

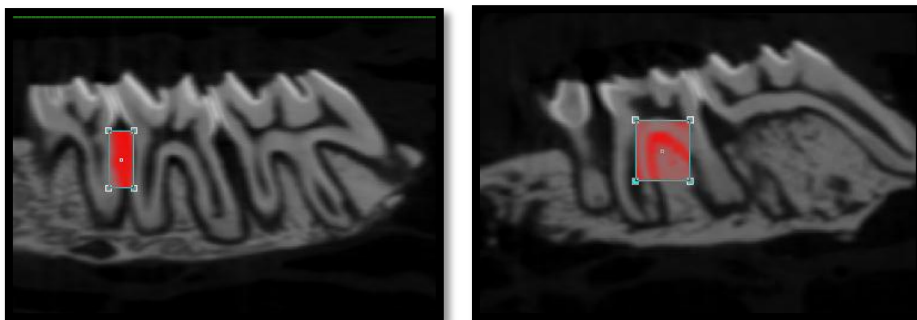
As articulações foram avaliadas histologicamente apenas para confirmar a efetividade do modelo de indução de artrite. Após a descalcificação em solução de EDTA a 7% (pH 7,2 em PBS) por 3 meses, as amostras foram processadas para inclusão em parafina e execução dos cortes histológicos. Foram confeccionadas 3 lâminas para cada articulação, com cortes sagitais seriados de 6 μm que foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). Foram descritos as condições da espessura da membrana sinovial, o infiltrado inflamatório e presença de erosão da cartilagem/osso.

Avaliação por microtomografia computadorizada

Após a fixação, as maxilas foram scaneadas em um microtomografo computadorizado (Skyscan, Aatselaar, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12.45; potência do tubo de raio-x: 65 kVP, intensidade do raio-x: 385 μA , tempo de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm e tamanho do voxel: 18 μm^3 . As imagens foram reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas por softwares específicos (NRcom, Data Viewer e CTan, Skyscan, Aatselaar, Bélgica). Foram executadas medidas lineares da junção cimento esmalte até o topo de crista

óssea que foi executado em 6 pontos ao redor do segundo molar superior (dois vestibulares associados a porção mediana das raízes mesiais e distais; dois palatinos também associados a porção mediana das raízes mesias e distais e um ponto na parte mediana de cada face proximal), sendo que os resultados de cada amostra foi a média dessas mensurações. Também foram executadas análises volumétricas da quantidade de tecidos mineralizados em duas áreas de interesse: 1) Duas regiões de interesse (ROI padronizado) nas regiões interproximais que iniciava-se da junção cimento esmalte do segundo molar e dos dentes adjacentes em direção ápices dentários, 2) Uma região de interesse associada a região de furca do segundo molar, iniciando-se do teto da furca em direção ápices dentários (Figura 7). O *threshold* utilizado na análise foi de 65-255 tons de cinza, e os valores do volume do tecido nas regiões de interesse foram expressos em porcentagem. Um examinador treinado e cego para os grupos experimentais executou essa análise

Figura 7 - Imagens representativas da análise volumétrica microtomográfica.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Foram analisadas duas regiões de interesse. 1) Duas regiões de interesse nas regiões interproximais que iniciava-se da junção cimento esmalte do segundo molar

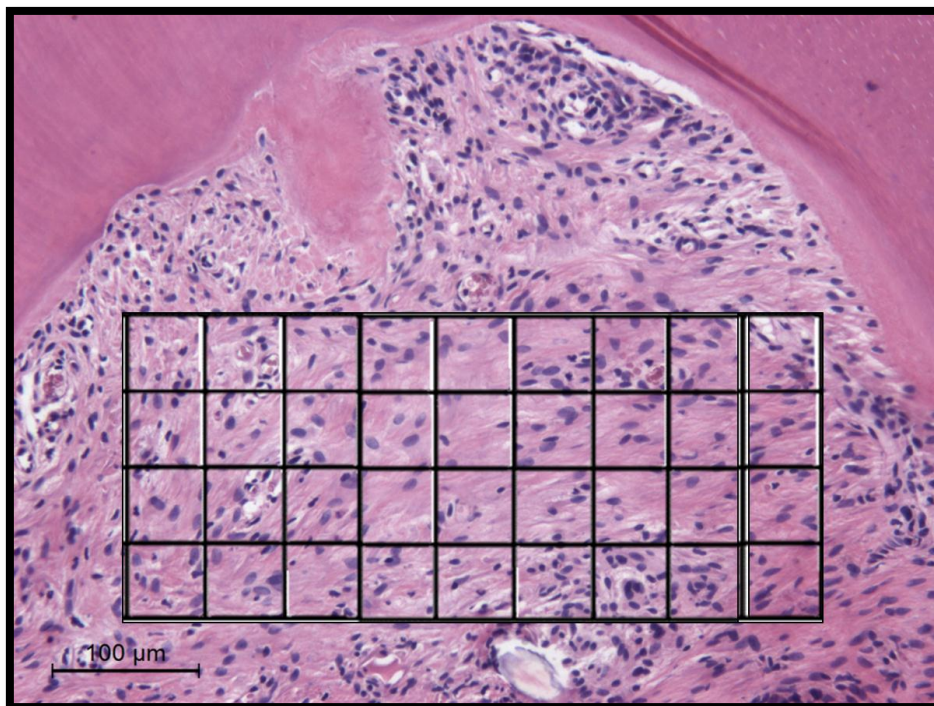
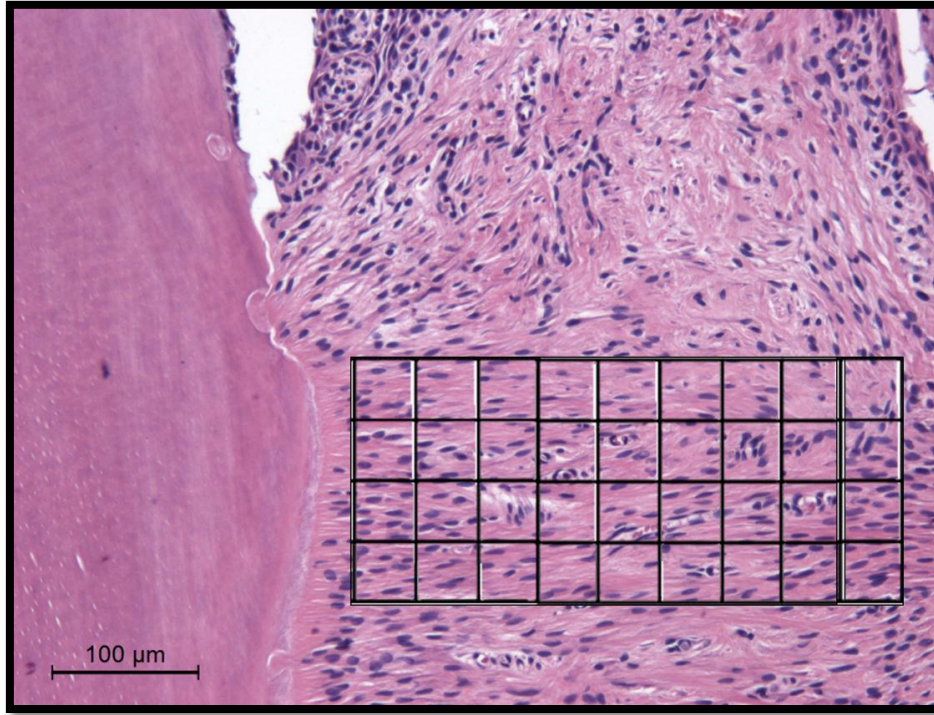
e dos dentes adjacentes até os ápices dentários, 2) Uma região de interesse associada a região de furca do segundo molar, iniciando-se do teto da furca até os ápices dentários.

Análise Estereométrica

Após descalcificação das amostras em EDTA 7% por 8 semanas, as mesmas foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 5 μm e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Utilizando-se de um microscópio óptico DIASTAR (LeicaReichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha) as imagens histológicas foram analisadas seguindo 3 cortes que distavam 60 μm entre si.

A técnica estereométrica de contagem de pontos foi empregada nos cortes corados para avaliação da proporção de componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção, em um plano bidimensional. Dessa forma, foi determinada a proporção dos seguintes componentes teciduais: matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Foram analisados as regiões proximais associadas as regiões abaixo do epitélio juncional e a região logo abaixo do teto da furca. Após a captura de imagens, a quantificação foi executada com o auxílio de grade confeccionada com 32400 μm^2 de área. Esta grade foi sobreposta às regiões de interesse da imagem utilizando o software Adobe Photoshop CS4. Para cada grade, foram contados 50 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados. (Figura 8)

Figura 8 - Imagens representativas da análise estereométrica onde foram analisadas as regiões proximais e a região de furca.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Análise Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos ao bloqueio dos epítomos inespecíficos e foram incubados por 16 horas com os anticorpos primários para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (1:200) e receptor ativador do fator nuclear κ B/ligante (RANKL) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA). Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados por PBS a 1%. Posteriormente, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados pelo DAB. Os cortes foram contra-corados com solução de hematoxilina de Carrazi. As imagens foram obtidas através de uma câmera acoplada a um microscópio de luz (Leica-Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Alemanha). O TRAP foi analisado por contagem enquanto que o RANKL foi analisado por um score de extensão de células marcadas^{21,46}: (0) Sem marcação (0% de células); (1) fraco (0-25% das células); (2) moderado (25-50% das células); (3) forte (>50% das células). A análise das expressões de TRAP e RANKL foram executadas nas regiões interproximais e de furca.

Análise estatística

O software Graphpad Prism 6 (San Deigo, CA, EUA) foi utilizado para execução da análise estatística. Os dados gerados pelas análises microtomográfica, estereométrica e de expressão de TRAP foram submetidos a análise da distribuição em relação a média por meio do teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Como os dados se distribuíram de acordo com a normalidade ($p < 0,05$), 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. Para a análise da expressão de RANKL foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5%.

ESTUDOS 1 E 2

Estudo 1: Efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja sobre o reparo ósseo alveolar em ratos com artrite e periodontite induzida

Grupos e tratamentos

Os animais foram randomicamente distribuídos em 3 grupos de acordo com a condição sistêmica e o uso do ASU: Grupo CTR-Animais com DP que foram submetidos a administração de solução salina; Grupo ART- Animais com DP e com artrite induzida que foram submetidos a administração de solução salina; Grupo ART/ASU: Animais com DP e artrite induzida que foram submetidos a administração de ASU (0.6 mg/Kg)⁴⁵. Os animais receberam a administração do ASU ou solução salina no dia da remoção da ligadura. Essa administração ocorreu de forma diária por gavagem até o dia da eutanásia dos animais, que ocorreu nos períodos de 7, 15 e 30 dias após a remoção das ligaduras.

Estudo 2: Efeito do uso adjunto do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja no tratamento da periodontite por ligadura em ratos com artrite induzida por antígeno

Grupos e tratamentos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o tipo de tratamento e a condição sistêmica dos animais: CTR: Animais com DP sem ART em que foi administrado solução salina; ASU: Animais com DP sem ART em que foram administrados o ASU (0,6 mg/Kg)⁴⁵; ART/ASU: Animais com DP e com artrite induzida em que foi administrado o ASU; ART: Animais com DP e com artrite induzida em que foi administrado o solução salina.

A periodontite foi induzida por meio da inserção de ligaduras com fio de algodão inseridos na região subgingival do segundo molar superior dos animais. Essas ligaduras foram mantidas por 15 dias, sendo que durante sua remoção foi executado uma raspagem radicular com auxílio de curetas Gracey do tipo mini-five (7-8, 11-12 e 13-14 - Hu-Friedy). Após o tratamento, o ASU e a solução salina foram administrados por gavagem diariamente até a eutanásia dos animais que ocorreu nos períodos de 7, 15 e 30 dias após o procedimento de raspagem (n=5 animais por grupo). Os animais foram submetidos a eutanásia por aplicação de anestésico em sobredosagem. Posteriormente, as maxilas e os joelhos de cada animal foram removidos e fixados em paraformaldeído a 4% por um período de 24 horas e foram posteriormente descalcificadas em EDTA a 7% por 60 dias para execução dos cortes histológicos.

Todos os animais resistiram aos procedimentos experimentais aplicados. Com relação ao tamanho da amostra, o dado da análise volumétrica do tecido ósseo

na face proximal foi definido como variável primária e foi utilizado como referência para confirmar o poder dos testes aplicados nesse estudo. Levando-se em consideração que a diferença mínima das médias para obtenção das diferenças estatisticamente significativas foi de 9,81 com desvio padrão de 4,61, a utilização de 5 animais do grupo permitiu a obtenção de erro do tipo α de 0.05 e poder β de 0,75 (Dados do estudo 2). Com relação a calibração dos examinadores, foi repetida a mensuração de 10% da amostra em relação as todas as análises do presente estudo e o índice de correção foi acima de 0,85.

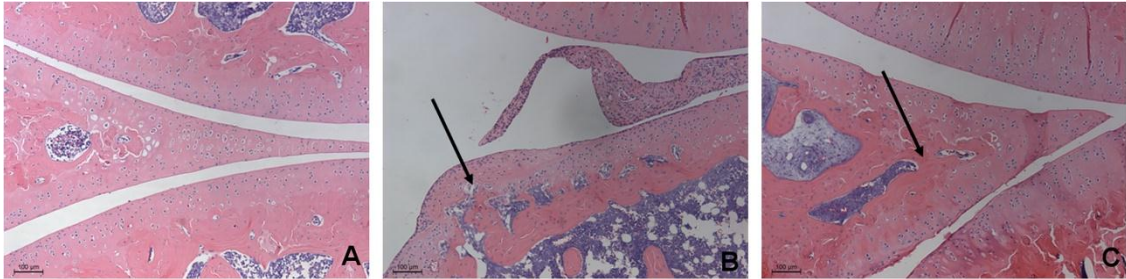
5 RESULTADOS

Estudo 1: Efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja sobre o reparo ósseo alveolar em ratos com artrite e periodontite induzida.

Análise das articulações

Foi verificado que as articulações do joelho do grupo CTR apresentaram aspecto normal do menisco com morfologia normal e cartilagem articular íntegra. Não foi notado quaisquer sinais de anormalidade nas articulações desse grupo como um todo. Nas articulações dos animais com artrite induzida pôde-se notar degradação do menisco e focos de reabsorção óssea nas articulações, bem como degradação da cartilagem articular. A aplicação do ASU reduziu esses efeitos da indução da artrite, entretanto alterações na morfologia do menisco puderam ser notadas (Figura 9).

Figura 9 - Imagens histológicas representativas das articulações de todos os grupos.



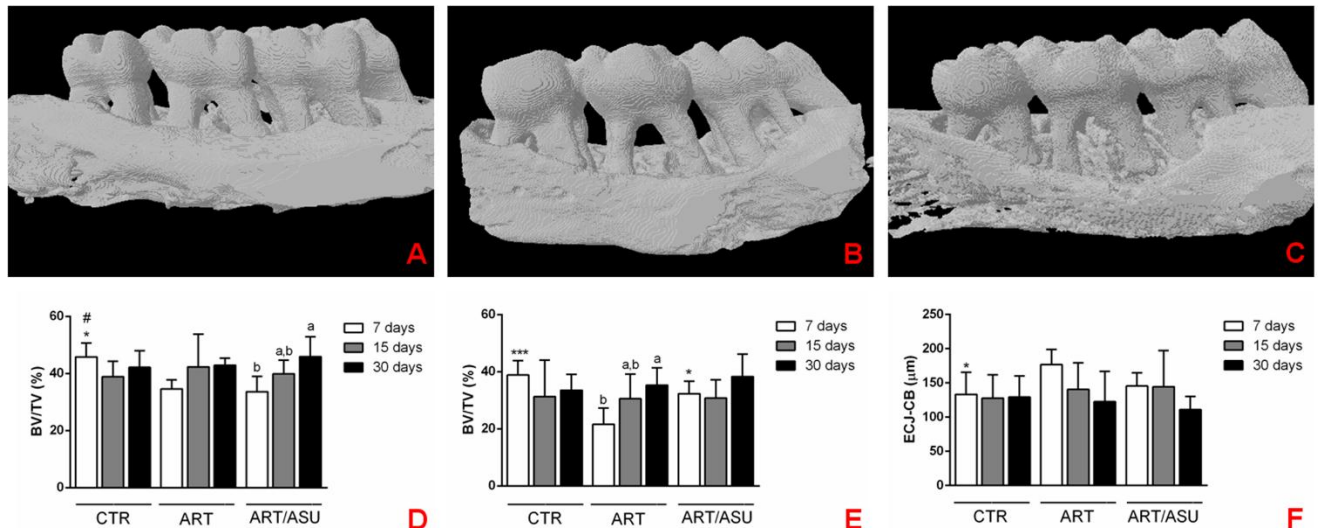
A) CTR: Pode-se notar a ausência de alterações nas estruturas da cartilagem articular e do menisco. Também não foi notada a presença de infiltrado inflamatório. B) ART: Nesse grupo foi verificado descontinuidade do menisco, degradação da cartilagem articular e presença de focos de reabsorção óssea e alteração da morfologia do tecido ósseo subcondral (seta negra). C) ART/ASU: Não foram verificados nessas articulações a degeneração da cartilagem articular, nem focos de reabsorção óssea, entretanto algumas alterações nos meniscos puderam ser notadas (setas negras) (Aumento original 100x-HE)

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Análise microtomográfica

Com relação a análise volumétrica, foi verificado que o grupo CTR ($45,83 \pm 4,88$ %) apresentou maior volume de osso na região de furca que os outros grupos no período de 7 dias ($34,55 \pm 3,20$ % no grupo ART e $33,64 \pm 5,33$ % no grupo ART/ASU) ($p < 0,05$). Os grupos CTR ($31,26 \pm 12,88$ %) e ART/ASU ($32,34 \pm 4,33$ %) apresentaram maiores volumes de osso interproximal do que o grupo ART ($21,61 \pm 5,72$ %) aos 7 dias ($p < 0,05$). Adicionalmente, foi verificado uma menor distância da JCE ao topo de crista óssea no grupo CTR ($133,3 \pm 32,12$ μm) em comparação ao grupo ART ($176,7 \pm 22,35$ μm) aos 7 dias ($p < 0,05$). (Figura 10).

Figura 10 - Imagens 3D provenientes do escaneamento por microtomografia computadorizada que representam todos os grupos no período de 7 dias, e os gráficos representativos das análises.



A)CTR, B)ART, C)ART/ASU: É possível notar o maior grau de reabsorção óssea no grupo ART em relação aos outros grupos. A utilização do ASU reduziu essa reabsorção óssea em animais com artrite induzida, entretanto esse efeito não foi o suficiente para alcançar o estado de reabsorção óssea presente no grupo CTR. D)BV/TV(%) da região interradicular; E)BV/TV (%) das regiões proximais e F) ECJ-CB (mm) distância da junção cimento-esmalte até o topo da crista óssea. O grupo CTR apresentou maiores volumes de osso e menor distância da ECJ-CB do que o grupo ART. Adicionalmente foi verificado um maior volume de osso nas proximais no grupo ART/ASU em relação ao grupo ART. Todas essas diferenças ocorreram no período de 7 dias. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey; # $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART/ASU-One-way anova complementado por Tukey. Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- One-way anova complementado por Tukey.

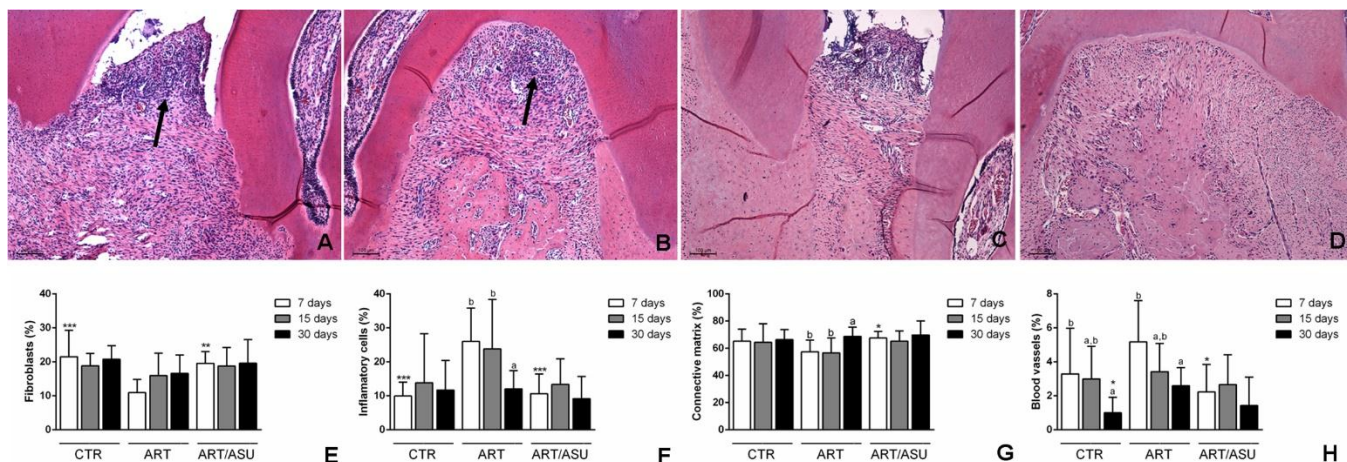
Fonte: Elaborado pelo autor.

Estereometria

Foi verificado que os grupos CTR e ART/ASU apresentaram maiores quantidades de fibroblastos ($21,52 \pm 7,79$ % e $19,59 \pm 3,46$ % nos grupos CTR e ART/ASU, respectivamente) e menores quantidades de células inflamatórias ($9,95 \pm$

4,05 % e $10,66 \pm 5,76$ % nos grupos CTR e ART/ASU, respectivamente) que o grupo ART ($10,95 \pm 3,85$ % e $26,03 \pm 9,08$ % de fibroblastos e células inflamatórias, respectivamente) no período de 7 dias ($p < 0,05$). Associado a isso, foi verificado que o grupo ART/ASU apresentou maior percentual de matriz extracelular ($67,52 \pm 4,96$ %) e menor quantidade de vasos sanguíneos ($2,33 \pm 1,61$ %) que o grupo ART ($57,44 \pm 8,65$ % e $5,17 \pm 2,42$ % de matriz e vasos sanguíneos, respectivamente) também aos 7 dias ($p < 0,05$). Adicionalmente a isso, foi verificado uma menor quantidade de vasos sanguíneos no grupo CTR ($1,00 \pm 0,91$ %) em comparação ao grupo ART ($2,59 \pm 1,06$ %) aos 30 dias ($p < 0,05$). (Figura 11).

Figura 11 - Imagens histológicas representativas e gráficos provenientes da análise estereométrica.



A) Região proximal representativa do grupo ART no período de 7 dias e B) Região da furca representativa do grupo ART no período de 7 dias: Em ambas as imagens pode ser notado a presença de infiltrado inflamatório (setas negras) que esteve associado a destruição óssea e redução do componente de matriz e fibroblastos. C) Região proximal representativa dos grupos CTR e ART/ASU no período de 7 dias e D) Região da furca representativa do grupo CTR e ART/ASU no período de 7 dias: A presença do infiltrado inflamatório pode ser notado também nesses grupos, mas em menor extensão do que foi notado no grupo ART. E) Fibroblastos; F) Células inflamatórias; G) Matriz de tecido conjuntivo e H) Vasos sanguíneos: De uma forma geral, os grupos CTR e ART/ASU apresentaram maiores quantidades de fibroblastos e menores quantidades de células inflamatórias do que o grupo ART no período de 7 dias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- One-way anova complementado por Tukey. (Aumento original 100x-HE)

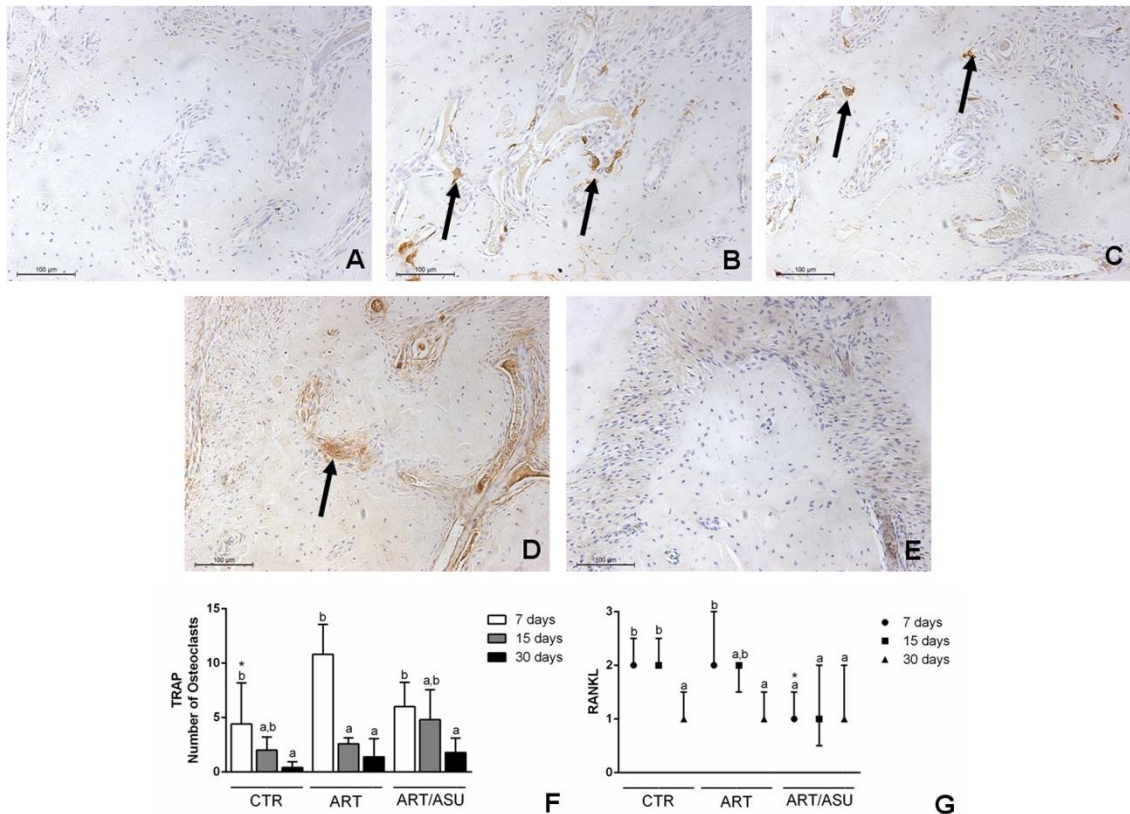
Fonte: Elaborado pelo autor.

Expressão de RANKL e TRAP

Foi verificado que aos 7 dias o grupo CTR ($4,40 \pm 3,78$ %) apresentou menores números de células TRAP positivas que os animais do grupo ART ($10,80 \pm 2,77$ %). Além disso, os animais do grupo ART/ASU mostraram menor expressão de RANKL que o grupo ART ($p < 0,05$). De uma forma geral, a expressão dessas proteínas reduziu em todos os grupos com o aumento do período de avaliação.

(Figura 12)

Figura 12 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica da expressão de TRAP e RANKL e os respectivos gráficos representativos da expressão dessas proteínas.



A) Controle negativo; B) TRAP grupo ART aos 7 dias; C) TRAP grupo CTR aos 7 dias: Pode ser verificado a expressão de TRAP em células osteoclásticas que estavam na proximidade do tecido ósseo (Setas negras); D) RANKL grupo ART aos 7 dias; E) RANKL grupo ART/ASU aos 7 dias: A expressão de RANKL pode ser notada em células próximas aos tecido ósseo ou nas vizinhanças de vasos sanguíneos (Setas negras). F) TRAP: Foi verificado maior expressão de TRAP no grupo ART em relação ao grupo CTR no período de 7 dias. * $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- One-way ANOVA complementado por Tukey. G) RANKL: Foi verificado uma maior expressão de RANKL no grupo ART em comparação ao grupo ART/ASU no período de 7 dias. * $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-Kruskall-Wallis complementado por Dunn; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- Kruskall-Wallis complementado por Dunn. (Aumento original 200x)

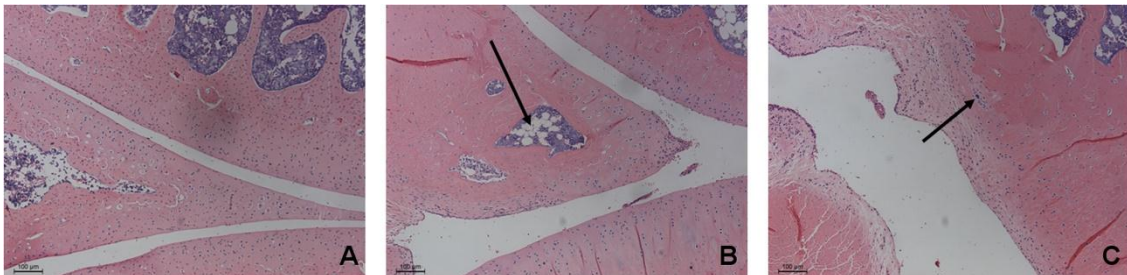
Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudo 2: Efeito do uso adjunto do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja no tratamento da periodontite por ligadura em ratos com artrite induzida por antígeno

A aplicação do ASU reduziu a degradação das articulações do joelho previamente submetidas a artrite induzida.

Foi verificada que a indução da artrite induziu degradação parcial da cartilagem articular e produziu focos de reabsorção do osso subcondral. A utilização do ASU evitou a degeneração da cartilagem articular e do tecido ósseo, entretanto alterações na morfologia do menisco puderam ser notadas. As articulações dos grupos CTR e ASU apresentaram-se com aspecto histológico normal (Figura 13).

Figura 13 - Imagens histológicas representativas das articulações dos joelhos.



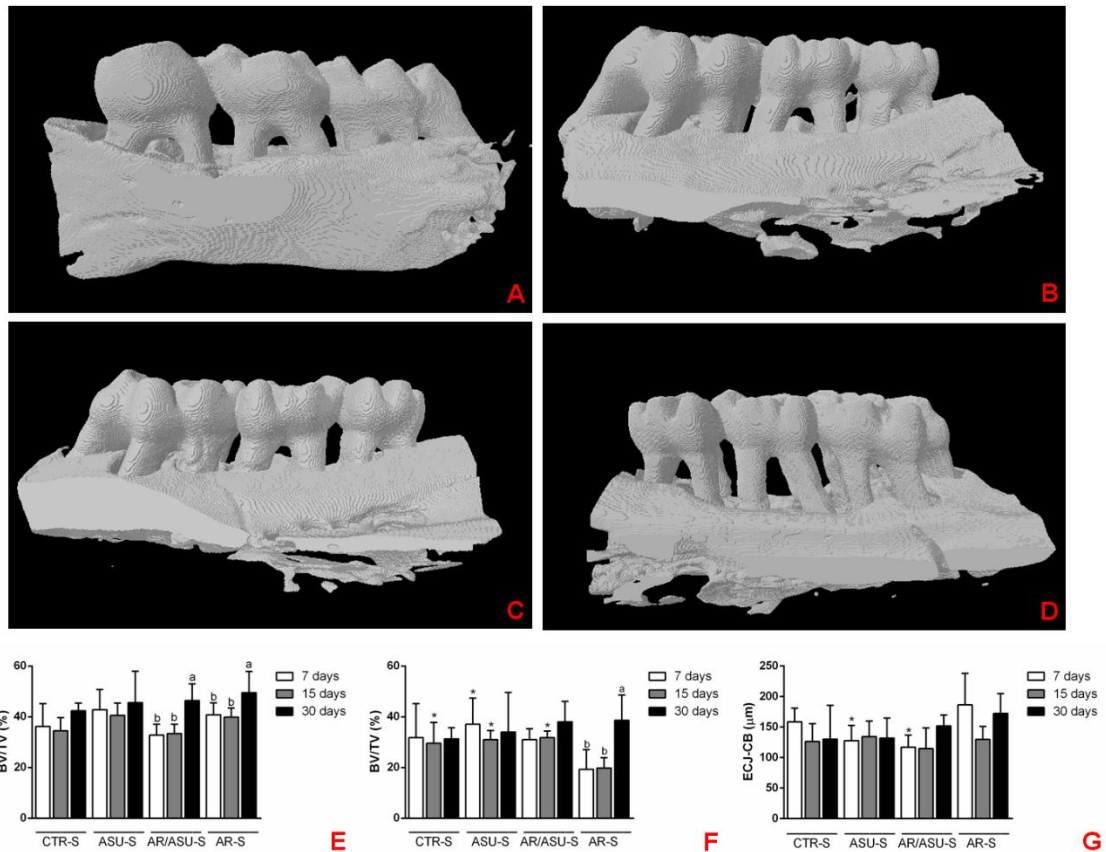
A:CTR e ASU; B) ART/ASU e C)ART. Pode ser verificado que as articulações no grupo CTR e ASU apresentaram aspecto de normalidade do menisco e dos tecidos cartilaginoso e ósseo. O grupo ART/ASU apresentou alterações morfológicas no menisco (setas negras), porém não foram identificadas alterações na cartilagem sinovial e no osso subcondral. No grupo ART foi observado alterações morfológicas nos meniscos, degradação da cartilagem articular e focos de reabsorção óssea do osso subcondral (Aumento original 100x-HE).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A aplicação do ASU reduziu a reabsorção óssea em animais com artrite experimental

Foi verificado uma menor distância da junção cimento-esmalte ao topo de crista óssea nos grupos ASU ($127,5 \pm 25,04 \mu\text{m}$) e ART/ASU ($116,9 \pm 19,79 \mu\text{m}$) em comparação ao grupo ART ($186,4 \pm 51,90 \mu\text{m}$) no período de 7 dias ($p < 0,05$). Também foi verificado um menor volume de osso associado as regiões proximais do segundo molar no grupo ART ($19,80 \pm 4,07 \%$) em comparação a todos os outros grupos no período de 15 dias ($29,61 \pm 8,19 \%$ no grupo CTR, $30,99 \pm 3,64\%$ no grupo ASU e $31,78 \pm 2,57$ no grupo ART/ASU). Adicionalmente, foi verificado que o grupo ART ($19,33 \pm 7,76 \%$) apresentou menor volume de osso nas proximais do que o grupo ASU ($37,10 \pm 10,31 \%$) no período de 7 dias ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos em relação ao volume de osso presente no espaço Inter radicular. (Figura 14)

Figura 14 - Imagens 3D representativas de todos os grupos no período de 15 dias e os gráficos provenientes da análise microtomográfica.



A) CTR; B) ASU; C) ART/ASU e D) ART. Pode-se observar que o grupo ART apresentou maior reabsorção do tecido ósseo que todos os outros grupos. E) BV/TV (%) da região interradicular; F) BV/TV (%) das regiões proximais e G) ECJ-CB (mm) distância da junção cimento-esmalte até o topo da crista óssea. * $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- One-way anova complementado por Tukey.

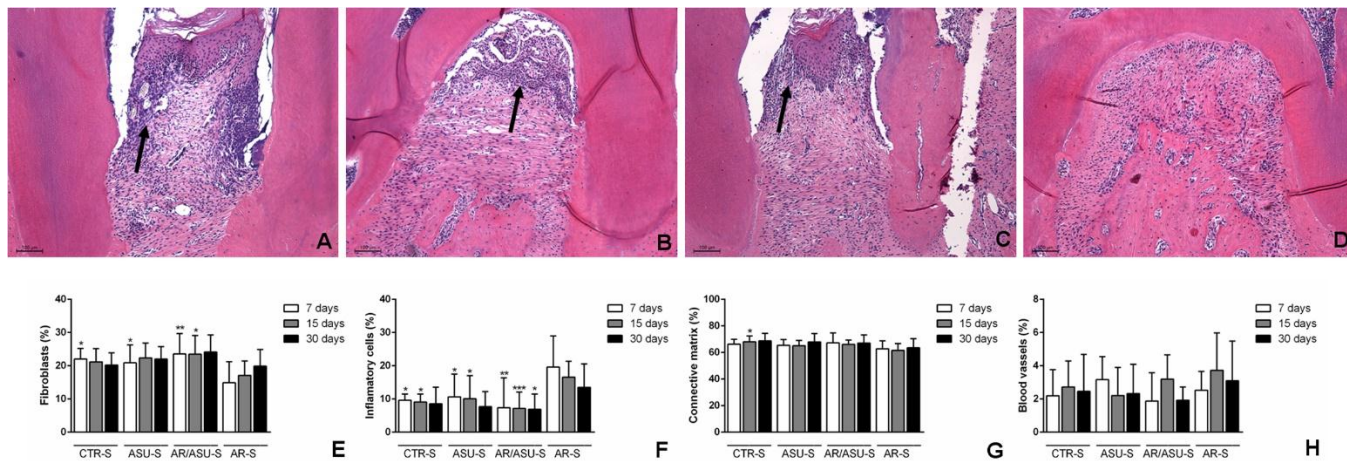
Fonte: Elaborado pelo autor.

A utilização do ASU reduziu o infiltrado inflamatório em animais com artrite experimental

Foi observada uma redução na quantidade de fibroblastos no grupo ART ($14,87 \pm 6,36$ %) em comparação aos grupos CTR ($22,02 \pm 3,23$ %) e ASU ($20,87 \pm$

5,43 %) aos 7 dias e em relação ao grupo ART/ASU aos 7 ($23,53 \pm 6,17$ %) e 15 dias ($23,50 \pm 5,99$ % no grupo ART/ASU vs. $17,10 \pm 4,31$ % no grupo ART) ($p < 0,05$). O grupo ART (13,51-19,61%) apresentou maior quantidade de células inflamatórias que todos os outros grupos e períodos de avaliação (6,87-10,66%), com exceção do grupo ASU no período de 30 dias ($p < 0,05$). Também foi detectado um maior percentual de matriz do tecido conjuntivo no grupo CTR ($68,07 \pm 4,26$ %) em comparação ao grupo ART ($61,60 \pm 5,10$ %) no período de 15 dias ($p < 0,05$). Não houve diferenças em relação a quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos em nenhum período experimental. (Figura 15).

Figura 15 - Imagens histológicas representativas das regiões A) proximais e B) da furca do grupo ART-S e das regiões C) proximais e D) da furca dos grupo CTR; ASU; ART/ASU.



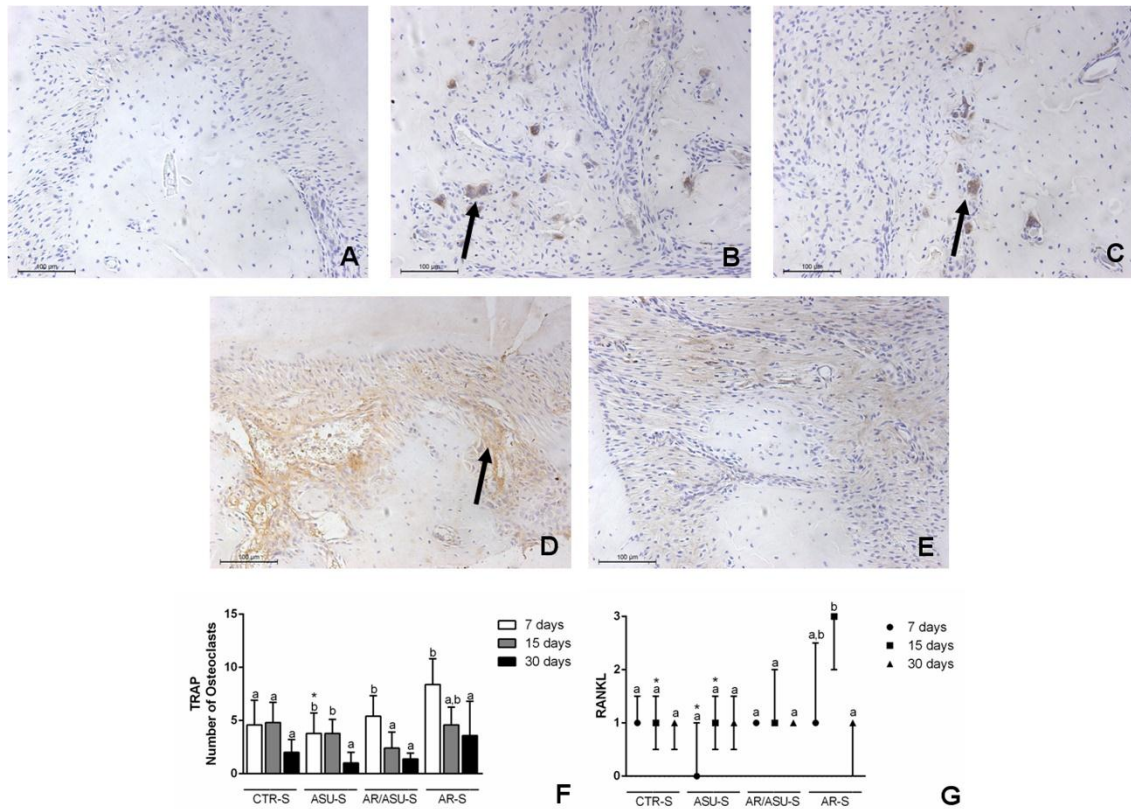
Pode-se notar a presença de um infiltrado inflamatório (Setas negras) maior no grupo ART, o que refletiu nos resultados da estereometria aonde foi detectado uma menor presença de fibroblastos e de componente de matriz de tecido conjuntivo e uma maior quantidade de células inflamatórias que todos os outros grupos. E) Fibroblastos; F) Células inflamatórias; G) Matriz de tecido conjuntivo e H) Vasos sanguíneos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey. (Aumento original 100x-HE)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A utilização do ASU reduziu a expressão de marcadores da função e diferenciação osteoclástica em animais com artrite experimental

Foi observado um maior número de células TRAP positivas no grupo ART ($8,40 \pm 2,40$ %) do que no grupo ASU ($3,80 \pm 1,92$ %) no período de 7 dias ($p < 0,05$). Adicionalmente a isso, foi verificado uma maior expressão de RANKL no grupo ART do que no grupo CTR aos 7 dias e do que no grupo ASU aos 7 e 15 dias ($p < 0,05$). De uma forma geral, a expressão dessas proteínas se reduziu nos períodos experimentais mais longos. (Figura 16).

Figura 16 - Imagens representativas da análise da expressão das proteínas TRAP e RANKL e seus respectivos gráficos.



A) Controle negativo; B) TRAP grupo ART aos 7 dias; C) TRAP grupo ASU aos 7 dias. A expressão de TRAP ocorreu nos osteoclastos que estavam nas proximidades do tecido ósseo (Setas negras) e essa expressão foi maior no grupo ART. D) RANKL grupo ART 7 dias; E) RANKL grupos ASU e CTR aos 7 dias. A expressão de RANKL aconteceu principalmente associado a células osteoblástica e na proximidade de vasos sanguíneos (setas negras), sendo que essa expressão foi maior no grupo ART. F) Expressão de TRAP: * $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-One-way anova complementado por Tukey; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo One-way anova complementado por Tukey. G) Expressão de RANKL: * $p < 0,05$ -Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo ART-Kruskall-Wallis complementado por Dunn; Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo- Kruskall-Wallis complementado por Dunn. (Aumento original 200x).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Foi verificado nesse estudo que a utilização do ASU promoveu uma menor reabsorção do tecido ósseo, uma redução do infiltrado inflamatório e uma redução em marcadores de atividade e diferenciação osteoclástica, especialmente em animais que estavam sobre interferência da artrite experimental nos dois tipos de abordagem, aonde foi verificado esses efeitos tanto em modelos de reparo periodontal após remoção das ligaduras como em modelo de aplicação do tratamento por raspagem após a remoção das ligaduras. Esses resultados confirmam os achados de que a utilização do ASU beneficia o reparo periodontal em modelos de periodontite experimental^{45,46}, entretanto, esse efeito parece ser mais nítido em condições que alteram o metabolismo ósseo, tal como foi demonstrado nesse estudo.

Os animais com artrite e que não foram submetidos ao tratamento com o ASU apresentaram maiores níveis de reabsorção óssea em relação a todos os outros grupos, bem como apresentaram maiores quantidades de células TRAP positivas e maior expressão de RANKL associado à maior quantidade de células inflamatórias. Esses achados estão de acordo com os estudos pré-clínicos que demonstraram que a presença da artrite induz uma resposta inflamatória mais destrutiva nos tecidos periodontais^{42,55}. Estudos clínicos também demonstraram que pacientes com artrite reumatoide apresentam doença periodontal com maior grau e taxa de progressão de destruição óssea^{5,7,41,51,52,54}, apesar desses achados não terem sido encontrados em outros estudos clínicos⁴⁹. Vale salientar que normalmente os pacientes que participam desses estudos estão sob terapia medicamentosa, algo que pode ser

controlado em estudos pré-clínicos, e esse fato pode ser a explicação para a inconsistência dos achados na relação das periodontites com a artrite reumatoide em humanos^{5,47}.

Foi verificado que a aplicação do ASU promoveu uma redução do infiltrado inflamatório especialmente no grupo de animais que apresentavam artrite induzida, bem como reduziram a presença de células TRAP positivas e a expressão de RANKL. Esses achados corroboram com estudos que demonstram que a utilização ASU reduz a expressão de mediadores inflamatórios em modelo de artrite reumatóide ou de periodontite experimental tal como a IL-1 β , TNF α , MMP-8, IL-6 que podem resultar na osteoclastogênese^{4,26,27,33}. Além disso, foi demonstrado anteriormente que a aplicação do ASU reduziu a expressão de RANKL e células TRAP positivas em um estudo que avaliou o efeito desse medicamento em um modelo de periodontite experimental em animais saudáveis⁴⁵. Essa redução do processo inflamatório e da osteoclastogênese corrobora os achados de proteção da reabsorção óssea promovidos pelo ASU principalmente em animais submetidos a indução de artrite.

Foi verificado na análise estereométrica que os animais que foram submetidos a administração de ASU apresentaram maiores quantidades de matriz de tecido conjuntivo e fibroblastos, o que demonstra que esse medicamento tem papel estimulador na cicatrização do tecido conjuntivo. Foi descrito anteriormente que a administração do ASU induz a expressão de TGF β 1 e TGF β 2 em fibroblastos gengivais e de BMP2 em osteoblastos². Adicionalmente, foi verificado que a administração do ASU estimula a produção de componentes importantes da matriz do tecido conjuntivo tais como colágeno e agregans^{9,25,26}. Esse fato reforça a informação de que o ASU é um medicamento que induz a modulação da resposta do

hospedeiro não apenas por suas propriedades anti-inflamatórias, mas também pelas suas propriedades de indução de proliferação do tecido conjuntivo^{3,9}.

Um ponto a ser salientado é que os pacientes sob terapia para tratamento de artrite normalmente estão sob terapia anti-inflamatória crônica que pode proteger os pacientes das perdas ósseas periodontais³⁵. Além disso, outros medicamentos utilizados para o tratamento de artrite tais como bisfosfonatos e anti-TNF α também tem demonstrado serem eficientes na manutenção do tecido ósseo periodontal³⁴, entretanto nenhuma dessas terapias é descrita como sendo totalmente segura. Além disso, as ausências de efeito na proliferação dos tecidos conjuntivos limitam os resultados positivos dessas terapias. Isso torna a utilização do ASU para o tratamento adjunto da doença periodontal interessante devido à ausência de efeitos colaterais e à ação tanto no bloqueio da inflamação como a estimulação da proliferação do tecido conjuntivo^{16,26,37}.

Esse estudo apresenta como limitação a comparação do ASU em animais com artrite induzida sem submissão a nenhum tipo de terapia para tratamento da artrite, pois dificilmente um paciente com artrite reumatoide e com periodontite estará sem nenhuma terapia para controle dessa patologia. Dessa forma, a comparação da terapia com ASU e outros medicamentos que são utilizados no tratamento da artrite reumatoide poderá representar uma situação mais realística com a prática clínica. Além disso, a utilidade do ASU como agente adjunto ao tratamento periodontal deve ser testada em situação aonde fatores de risco mais estabelecidos como influenciadores na progressão da doença periodontal (eg. Diabetes, tabagismo) estejam presentes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) A administração do ASU melhora o reparo ósseo alveolar em modelo de periodontite experimental aplicada em ratos com artrite induzida.
- 2) A administração do ASU promoveu uma melhora no reparo periodontal após tratamento da periodontite por ligadura em animais com artrite induzida por antígeno.

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Äyräväinen L, Leirisalo-Repo M, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Meurman JH, et al. Periodontitis in early and chronic rheumatoid arthritis: a prospective follow-up study in Finnish population. *BMJ Open*. 2017; 7(1):e011916.
- 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.

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

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Calderaro DC, Corrêa JD, Ferreira GA, Barbosa IG, Martins CC, Silva TA, Teixeira AL. Influence of periodontal treatment on rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rev Bras Reumatol.* 2017; 57(3): 238-44.
- 13) Catunda IS, Vasconcelos BC, Andrade ES, Costa DF. Clinical effects of na avocado-soybean unsaponifiable extract on arthralgia and osteoarthritis of the temporomandibular joint: preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 45(8): 1015-22.
- 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) Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16(4): 399-408.
- 16) Christiansen BA, Bhatti S, Goudarzi R, Emami S. Management of osteoarthritis with Avocado/Soybean unsaponifiables. *Cartilage.* 2015; 6(1): 30-44.

- 17) 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.
- 18) de Oliveira GJ, de Paula LG, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Spolidório LC, Marcantonio E Jr, et al. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014; 29(4): 949-57.
- 19) 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.
- 20) Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(1): 106-15.
- 21) Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol.* 2013; 84(4): 556-65.
- 22) 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.
- 23) Głuszko P, Stasiak M. Symptom-modifying effects of oral avocado/soybean unsaponifiables in routine treatment of knee osteoarthritis in Poland. An open, prospective observational study of patients adherent to a 6-month treatment. *Reumatologia.* 2016; 54(5): 217-26.
- 24) Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profile in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(12): 1046-52.
- 25) Goudarzi R, Taylor JF, Yazdi PG, Pedersen BA. Effects of Arthrocen, an avocado/soy unsaponifiables agent, on inflammatory mediators and gene expression in human chondrocytes. *FEBS Open Bio.* 2017; 7(2): 187-94.

- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2004; 75(1): 37-43.
- 29) Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 144-63.
- 30) Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 294-315.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.

- 35) Lequesne M, Maheu E, Cadet C, Dreiser RL. Structural effect of avocado/soybean unsaponifiables on joint space loss in osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 2002; 47(1): 50-8.
- 36) 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.
- 37) Lippiello L, Nardo JV, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of avocado/soybean unsaponifiables on articular chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008; 5(2): 191-7.
- 38) Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine.* 2008; 41(2): 84-91.
- 39) Maheu E, Cadet C, Marty M, Moyse 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.
- 40) 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.
- 41) Mercado F, Marshal R, Klestov A, Bartold P. A relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J Periodontol.* 2001; 72(6): 779–87.
- 42) 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.
- 43) Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. *Mod Rheumatol.* 2009; 19(5): 453–6.
- 44) Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, et al. Periodontal treatment decreases levels of antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2013; 84: 74–84.
- 45) Oliveira GJ, Paula LG, Souza JA, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Marcantonio RA. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on ligature-induced bone loss

- and bone repair after ligature removal in rats. *J Periodontal Res.* 2016; 51(3): 332-41.
- 46)Oliveira GJ, Paula LG, Souza JA, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Marcantonio RA. Effects of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on the treatment of ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res.* 2017; 31: 28.
- 47)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.
- 48)Paula LG. Effect of the avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on osseointegration in rats with experimental arthritis. In: 33° Sociedade Brasileira Pesquisa em Odontologia; 2016 set; Campinas, SP. Campinas: SBPqO; 2016.
- 49)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.
- 50)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.
- 51)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.
- 52)Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13(10): 606-20.
- 53)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.
- 54)Silvestre-Rangil J, Bagán L, Silvestre FJ, Martinez-Herrera M, Bagán J. Periodontal, salivary and IL-6 status in rheumatoid arthritis patients. A cross-sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017; 22(5):e595-e600.
- 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) 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

ANEXO A - 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® CONDUTA 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 B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



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

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 27/09/2019
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 27 de setembro de 2017
Jackeline do Nascimento Tsurumaki