

Roney Rick de Carvalho

**AVALIAÇÃO DA MANGIFERINA NA
PERIODONTITE INDUZIDA EM
RATOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista – UNESP para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Farmacologia)**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clélia Akiko Hiruma Lima
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Helena Pellizzon

Botucatu – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Carvalho, Roney Rick de.

Avaliação da mangiferina na periodontite induzida em ratos / Roney Rick de Carvalho. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientadora: Clélia Akiko Hiruma Lima

Co-orientadora: Claudia Helena Pellizzon

Assunto CAPES: 20400004

1. Periodontite - Aspectos farmacológicos - Estudos experimentais
2. Farmacologia

CDD 615.1

Palavras-chave: ; inflamação; mangiferina; lipoxina; periodontite; perda óssea alveolar

*Ó Senhor Deus, que todo o meu ser te louve!
Que eu louve o Santo Deus com todas as minhas forças!
Que todo o meu ser louve o Senhor,
e que eu não esqueça nenhuma das suas bênçãos!
O Senhor perdoa todos os meus pecados
e cura todas as minhas doenças;
Ele me salva da morte e me abençoa com amor e bondade.
Ele enche a minha vida com muitas coisas boas,
e assim eu continuo jovem e forte como a água.*

Rei Davi

Salmo 103:1-5

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele em minha vida nem mesmo este simples ato de escrever uma dedicatória seria possível.

Agradecimentos

Á minha esposa **Mariella**, pelo amor, companheirismo e conforto em todos os momentos, inclusive aqueles em que os experimentos davam errados e eu voltava para casa fedendo xixi de rato.

Aos meus pais **José Reis** e **Maria da Conceição** por todos os ensinamentos, os quais contribuíram tanto para a minha educação pessoal como profissional, e que sempre fizeram de tudo para me ajudar em todas as circunstâncias da minha vida. Sempre valorizando a honestidade, a honra e a humildade.

Aos meus irmãos (**Ronaldo, Rosane, Roseli e Rovilson**), cunhados (**Karla, Manuela, Marcella, Paulinho, e Regina**), co-cunhados (**Alfredo e Rodrigo**), sobrinhos (**Igor, Karine, Laura, Lincoln, Paulo, Rafael, Regiane e Vinícius**) pelo apoio e por fazerem parte da minha vida, sendo a minha riqueza.

Á minha orientadora **Profª. Drª. Clélia Akiko Hiruma Lima**, pelo voto de confiança em aceitar me orientar, pela paciência que teve comigo devido as minhas limitações e dificuldades, pelo respeito sempre presente, pelos elogios e vontade de me ver crescer.

Á minha co-orientadora **Profª. Drª. Claudia Helena Pellizzon**, pela paciência, dedicação e disposição em me ajudar.

Aos meus colegas de laboratório: **Ana Paula, Ariane, Bruno, Catharine Ferrazoli, Catharine Massucato, Celi, Fábio, Flávia, Hélio, Patrícia, Paulo, Raquel, Roberta, Thiago e Vitor**, por todas as vezes que me ajudaram em todos os aspectos.

Á todos os professores do departamento de Farmacologia e á **Profª. Drª. Lúcia Regina Machado Rocha** pelo empenho na minha formação como docente.

Aos funcionários: **Sr. Junior, Janete e Luciana** pelo bom desempenho de suas funções e pela boa convivência.

Á CAPES e BIOTA-FAPESP pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!!!

Prólogo

Além da realização deste projeto de mestrado, outras atividades foram realizadas com a finalidade de enriquecer a formação profissional do aluno.

Dentre estas atividades estão:

Apresentação de trabalhos em Eventos Científicos

Carvalho RR, Pellizzon CH, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Redução da periodontite promovida pela administração de mangiferina em ratos – No 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007.

Carvalho RR, Pellizzon CH, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. A mangiferina diminui a celularidade do processo inflamatório na periodontite induzida em ratos – No 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007.

Rodrigues ML, Rolla A, Macedo CS, Silva NCC, **Carvalho RR**, Cordellini S, Carvalho LR, Bissacot DZ. Informações telefônicas atendidas pelo CEATOX – Botucatu/SP sobre tentativas de suicídio, no período de 2001 a 2005. No XV Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, realizado no período de 19 a 26 de outubro de 2006.

Disciplinas cursadas

- Tópicos de Atualização em Ciências (2 créditos, 30 horas-aula).
- Estatística Aplicada (2 créditos, 30 horas-aula).
- Parâmetros de Sensibilidade a Drogas (4 créditos, 60 horas-aula).
- Farmacocinética (3 créditos, 45 horas-aula).
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (3 créditos, 45 horas-aula).
- Farmacologia do Trato Digestório (2 créditos, 30 horas-aula).

Realização estágio, cursos e participação em Eventos Científicos

Estágio docência, junto à disciplina de Fisiologia, do curso de Física-Médica, Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, realizado no período de 10 a 31 de maio de 2007.

(30 horas).

Participação como ouvinte do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007.

Participação como ouvinte do curso “Desenvolvendo novos medicamentos: da bancada ao leito” – no 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE, realizado no período de 17 a 20 de outubro de 2007. (3 horas).

Colaboração nos ensaios biológicos de analgesia da Tese de Doutorado: "Estudo de Metalofármacos Antiinflamatórios de Cobre e dos Materiais Híbridos Resultantes de suas Imobilizações no Hidróxido Duplo Lamelar Hidrotalcita: Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Farmacológica". Cláudia R. Gordijo, 04/outubro/2007, Instituto de Química da USP, São Paulo, SP. Orientadora: Denise de Oliveira Silva.

Participação como ouvinte do I Workshop de Extensão Universitária do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, realizado no dia 03 de maio de 2007.

Participação como membro da comissão organizadora do III Curso de Fisiologia Animal, realizado no Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, no período de 29 de janeiro a 02 de fevereiro de 2007.

Palestrante da aula: “Aspectos Gerais da Sazonalidade e Fisiologia Animal”, no III Curso de Fisiologia Animal, realizado pelo Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, no dia 29 de janeiro de 2007. (2 horas).

Membro Titular da 24ª Liga Acadêmica de Toxicologia – CEATOX. Universidade Estadual Paulista, UNESP – Botucatu, no período de 01 de março a 30 de setembro de 2006. (428 horas).

Participação do curso “Toxicologia Aplicada” – CEATOX. Universidade Estadual Paulista, UNESP- Botucatu, realizado no período de 06 a 11 de fevereiro de 2006. (30 horas).

Monitor do Mini Curso “Potencial Antiulcerogênico do Cerrado e Mata Atlântica” no VII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, realizado nos dias 02 e 03 de junho de 2006.

Participação como membro da comissão organizadora do XVIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista – UNESP, realizado em novembro de 2006.

Participação como membro avaliador de painel do XVIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual Paulista – UNESP, realizado em novembro de 2006.

Participação como membro da comissão organizadora do I Encontro Nacional sobre Ética na Experimentação Animal, IBB – UNESP, realizado no período de 25 a 27 de outubro de 2006.

Participação como ouvinte do 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE, realizado no período de 18 a 21 de outubro de 2006.

Participação como ouvinte da XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizado no período de 23 a 26 de agosto de 2006.

Participação como membro da comissão de apoio do VII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, IBB – UNESP, realizado nos dias 02 e 03 de junho de 2006.

Participação como ouvinte do curso “Como Escrever um Artigo e um Projeto para Publicação e Financiamento” – na XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizado no período de 23 a 26 de agosto de 2006. (2 horas e 15 minutos).

Participação como ouvinte do curso “Farmacologia Clínica” – no 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE, realizado no período de 18 a 21 de outubro de 2006. (2 horas e 30 minutos).

RESUMO

Na população mundial, existe uma elevada prevalência de periodontite que é responsável por grande parte da perda dentária nos indivíduos. Portanto, existe uma constante busca por novas opções terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento de periodontite. Neste trabalho, avaliamos os efeitos de uma substância natural, a mangiferina - uma xantona glicosilada obtida da *Mangifera indica*, sobre a doença periodontal experimental induzida em ratos. Os mecanismos de ação pela qual a mangiferina exerce sua ação, também foram alvos deste trabalho, bem como os prováveis efeitos tóxicos decorrentes de seu tratamento (1, 4 ou 7 dias). A periodontite foi induzida em ratos machos Wistar (~180 g) aplicando-se uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito. Os animais receberam diariamente pela via oral o veículo (salina 10 mL/kg), piroxicam (20 mg/kg) ou mangiferina (100 mg/kg). Nos dias 1, 4 ou 7 após a aplicação da ligadura, os animais foram mortos e a perda óssea alveolar (POA) foi determinada. Com a finalidade de elucidar os mecanismos de ação da mangiferina sobre a POA, realizamos as quantificações da celularidade presente nos tecidos gengivais, avaliamos a expressão de COX-2 neste tecido e determinamos o rolamento e adesão leucocitária. Também avaliamos a atuação da mangiferina sobre os níveis de lipoxina A₄ e sobre a ação das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9. A ativação da angiogênese e da proliferação celular também foi alvo de avaliação nos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Os possíveis efeitos tóxicos da administração da mangiferina foram avaliados através da evolução do peso corporal, pesos dos órgãos vitais (coração, fígado, pulmões, rins e baço) e também pela determinação bioquímica (uréia, creatinina, gama-GT, ALT, AST e glicose) do soro dos animais. A administração oral de mangiferina reduziu a POA após 1 dia ($p < 0,05$), 4 dias ($p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,001$) de indução da periodontite quando comparado com os animais tratados com

salina. Observamos também uma redução do número de células dos tecidos gengivais dos animais tratados com mangiferina, indicando um menor recrutamento de células inflamatórias para o local. Estes dados podem ser explicados pela tendência da mangiferina em inibir a COX-2 e também pela inibição do rolamento e adesão leucocitária promovida pela mangiferina. A mangiferina também exerceu ação anti-quimiotática de mediadores inflamatórios pela manutenção dos níveis normais de lipoxina A₄. A mangiferina não interferiu na atividade das MMPs 2 e 9, porém não podemos excluir uma possível ação inibitória sobre a expressão destas enzimas. A redução da POA induzida pela mangiferina, também pode ser explicada pelo aumento na formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e pelo pico de proliferação celular mais precoce que acarretou na aceleração no processo de reparo. Além da eficácia da mangiferina sobre a POA, este estudo comprovou a segurança de uso da mangiferina que não apresentou efeitos tóxicos em nenhum dos parâmetros avaliados. Nossos resultados demonstraram, portanto, que a mangiferina representa grande potencial terapêutico tanto na prevenção como no tratamento da periodontite.

ABSTRACT

In the global population, there is an elevated prevalence of periodontitis that is responsible for a large portion of tooth loss in individuals, thus provoking a constant search for new therapeutic options that treat this affliction more efficaciously and safely. In the present work, we evaluate the effects of a natural substance, mangiferin - a glycosylated xanthone obtained from *Mangifera indica* - on periodontal disease experimentally induced in rats. The action mechanisms by which mangiferin exerts its action were also targets of our study, as well as the toxic effects resulting from resulting its application (1, 4 or 7 days). Periodontitis was induced in male Wistar rats (~180 g) by applying a ligature around the right inferior primary molar. The animals received the vehicle daily by the oral route (saline 10 mL/kg), piroxicam (20 mg/kg) or mangiferin (100 mg/kg). On days 1, 4 or 7 after ligature application, the animals were sacrificed and alveolar bone loss (ABL) was determined. In order to elucidate the mechanisms of mangiferin action on ABL, we quantified the cellularity present in gingival tissues, evaluated COX-2 expression in this tissue and determined rolling and leukocyte adhesion. We also evaluated the performance of mangiferin on lipoxin A₄ levels and the action of metalloproteinases (MMPs) 2 and 9. Activation of angiogenesis and cellular proliferation were also targets of assessment in animals submitted to the different treatments. The possible toxic effects of mangiferin administration were evaluated through the evolution of body weight, vital organ weights (heart, liver, lungs, kidneys and spleen) and also by biochemical determination (urea, creatinine, gamma-GT, ALT, AST and glucose) in animal serum. Oral mangiferin administration reduced ABL after 1 day ($p < 0.05$), 4 days ($p < 0.001$) and 7 days ($p < 0.001$) from periodontitis induction, compared to saline-treated animals. We also observed a reduction of cell number in gingival tissue in animals treated with mangiferin, indicating lower recruitment of

inflammatory cells to the location. These data can be explained by the tendency of mangiferin to inhibit COX-2 and also by inhibition of rolling and leukocyte adhesion promoted by mangiferin. Mangiferin also exerts anti-chemotactic action of inflammatory mediators by maintenance of normal lipoxin A₄ levels. Mangiferin did not interfere in the activity of MMPs 2 and 9, but we could not exclude a possible inhibitory action on the expression of these enzymes. The drop in ABL induced by mangiferin, can also be explained by increased formation of blood vessels (angiogenesis) and by an earlier peak of cellular proliferation that led to acceleration of the repair process. Besides the efficacious action of mangiferin on ABL, this study demonstrated the safety of mangiferin by showing that its use did not present toxic effects in any of the parameters evaluated. Our results demonstrated, therefore, that mangiferin represents great therapeutic potential as much in prevention as in treatment of periodontitis.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO -----	13
▪ A Doença Periodontal -----	14
▪ Produtos Naturais -----	16
▪ Mangiferina -----	17
OBJETIVOS -----	19
MATERIAL E MÉTODOS -----	21
▪ Drogas -----	22
▪ Animais -----	22
▪ Anestesia -----	23
▪ Indução da Doença Periodontal -----	24
▪ Obtenção das Lâminas Histológicas -----	24
▪ Análise Histométrica -----	25
▪ Contagem de Células Totais -----	25
▪ Análise Imunohistoquímica -----	25
▪ Análise Intravital -----	26
▪ Determinação da Concentração de Lipoxina A₄ -----	27
▪ Determinação da Atividade de Metaloproteinases -----	28
▪ Evolução do Peso Corporal -----	28
▪ Peso dos Órgãos Vitais -----	29
▪ Avaliação Bioquímica do Soro -----	29
▪ Análise Estatística -----	29
ARTIGO -----	30
CONCLUSÕES -----	60
REFERÊNCIAS -----	62
APÊNDICE -----	68

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal inflamatória crônica é um problema de saúde oral da população, responsável por grande parte da perda dentária no adulto (1). A periodontite conduz a uma destruição dos tecidos que suportam o dente, incluindo a destruição do ligamento periodontal e a reabsorção óssea alveolar, que em casos severos leva a uma mobilidade e perda dentária (2).

A patogênese da periodontite está relacionada com a formação de colônias de microorganismos presentes na placa bacteriana subgengival, incluindo algumas bactérias anaeróbicas gram-negativas, bastonetes móveis, espiroquetas, assim com vírus (3-5). Entretanto a periodontite também pode ser causada por alterações na resposta imunológica (6-9).

Dentre as bactérias gram-negativas mais importantes estão as *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteriodes forsythus* no caso da periodontite crônica, e os *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) no caso da periodontite agressiva localizada. Estes microorganismos possuem fatores de virulência que aumentam a sua infectividade e fornece condições para a sua multiplicação e persistência no periodonto (10).

A presença destes microorganismos leva a formação de um biofilme dental (placa bacteriana) que inicia uma resposta inflamatória no indivíduo. Esta resposta inflamatória resulta na formação de edema, infiltração de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios. A consequência final deste processo é a formação de bolsa periodontal, destruição dos ligamentos periodontais, e reabsorção óssea alveolar, que resulta na perda dentária (11).

O infiltrado de leucócitos é um processo de múltiplos passos, caracterizado por

sua migração (rolamento) ao sofrer a ação das quimiotaxinas, adesão às células endoteliais e transmigração através do endotélio. A interrupção de qualquer um destes passos constitui um alvo em potencial para as drogas antiinflamatórias (12-14).

Vários mediadores químicos estão envolvidos neste processo, dentre eles destacam-se as prostaglandinas, cujas principais ações são a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar, o que favorece a infiltração de leucócitos e conseqüente processo inflamatório. As prostaglandinas são formadas a partir do ácido araquidônico pela ação das enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2), sendo a COX-1 constitutiva e a COX-2 induzível, a qual é encontrada abundantemente na doença periodontal (15-17). Além das prostaglandinas, o ácido araquidônico fornece outros mediadores químicos como as lipoxinas A₄, que agem como antiinflamatórios endógenos por apresentar ação antiquimiotáxica, ou seja, inibindo o rolamento de leucócitos. As lipoxinas funcionam como um “stop” da inflamação diminuindo o recrutamento de leucócitos e sua relação com a periodontite tem sido demonstrada por vários autores, sendo alvo em potencial para novas estratégias de tratamento (18, 19).

Simultaneamente a estes processos descritos anteriormente, ocorre a ação das metaloproteinases (MMPs), as quais constituem uma importante família de enzimas que utilizam diversos componentes da matriz extracelular e membrana basal como substratos. Estas enzimas são fundamentais no crescimento, no reparo e na remodelagem dos tecidos, mas estão envolvidas também na destruição de tecidos em casos patológicos como na doença periodontal. Particularmente, as MMP-2 e -9 pertencentes ao grupo das gelatinases têm sido identificadas como predominantes tanto na periodontite em humanos como em ratos, enfatizando as suas relações com a reabsorção óssea decorrente do processo inflamatório periodontal (20-22).

Em contrapartida aos efeitos danosos do processo inflamatório anteriormente descrito, outros eventos como a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e a

proliferação celular auxiliam na regeneração dos tecidos periodontais lesados (23, 24).

Estudos clínicos e histológicos da doença periodontal em ratos têm demonstrado uma similaridade com a periodontite em humanos (25), por isso os ratos têm sido comumente utilizados como modelo animal em estudos da doença periodontal (26).

A periodontite, é portanto, caracterizada por um processo inflamatório com conseqüente perda óssea. Diante desses dados, a terapêutica coadjuvante empregada para a periodontite inclui principalmente drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs) que têm a função de regredir os danos causados pela doença periodontal.

Porém, esta terapêutica não tem apresentado resultados satisfatórios devido aos diversos efeitos colaterais apresentados pelos AINEs como: lesões do trato gastrointestinal, incluindo sangramentos, perfurações, obstruções, ulcerações e a doença diverticular sintomática, além de aumento no risco de infarto do miocárdio (27-30).

PRODUTOS NATURAIS

A terapêutica através de produtos naturais na odontologia vem ganhando espaço em especial no mercado internacional. Historicamente comprova-se que a fitoterapia em odontologia assim como a fitoterapia de um modo geral, é muito mais do que uma alternativa econômica ou terapêutica. Atualmente, os estudos na área têm validado cientificamente o conhecimento popular no uso das plantas e deste modo, estes estudos têm considerado que a fitoterapia tem-se tornado uma terapia de primeira linha e não apenas uma terapia alternativa (31).

Milhares de plantas medicinais, utilizadas na medicina tradicional chinesa, indiana, sul-americana, dentre outras, ainda não foram estudadas cientificamente, do ponto de vista farmacológico, toxicológico ou clínico. O desenvolvimento científico e tecnológico de medicamentos derivados de produtos naturais é estratégico para o Brasil,

pois a descoberta de novos compostos com atividade biológica está relacionada com o manejo científico, técnico, e também político que se dá aos recursos naturais (32).

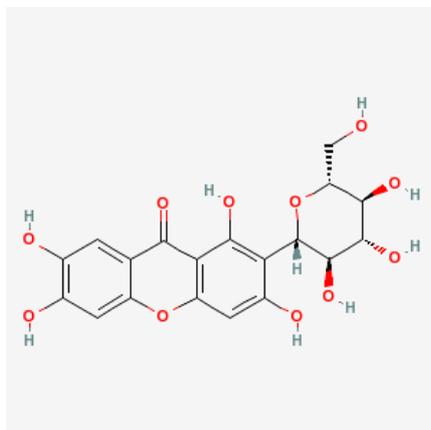
Uma seleção criteriosa das espécies a serem estudadas, sempre levando em consideração a indicação popular de uso medicinal (etnofarmacologia) e principalmente a participação de uma equipe multidisciplinar que realize um biomonitoramento químico e farmacológico das substâncias biologicamente ativas em todas as etapas da pesquisa representa uma grande margem de sucesso na caracterização e isolamento das substâncias com atividade terapêutica efetiva (33, 34).

O desenvolvimento de uma indústria nacional de fitoterápicos é fundamental para o progresso da ciência no Brasil, ao considerar a sua imensa biodiversidade e inegável capacitação técnico-científica (35).

MANGIFERINA

A Mangiferina é o componente majoritário (10%) da *Mangifera indica* L. (manga) pertencente à família Anacardiaceae, uma planta que cresce em regiões tropicais e subtropicais, amplamente utilizada pela medicina popular para várias indicações (36).

Estrutura química da Mangiferina



Sigma-Aldrich

A mangiferina é uma xantona glicosilada (1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona-C2-beta-d-glicosada) de ocorrência natural (37), que tem sido descrita por seus efeitos imunomoduladores (38, 39) e antiinflamatório. A ação antiinflamatória da mangiferina ocorre por inibição da expressão de COX-2, NF- κ B (fator de transcrição nuclear-kappa B) responsável pela ativação de macrófagos, TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa) e IL-1 (interleucina 1), todas citocinas muito importantes no processo inflamatório e na reabsorção óssea (39-42). A mangiferina também promove a inibição de PGE₂ (prostaglandina E₂) e LTB₄ (leucotrieno B₄) mediadores eicosanóides intimamente relacionados com a inflamação (43).

Sua atividade anti-reabsortiva óssea em modelo de vértebra lombar foi comprovada no modelo experimental descrito por Li e colaboradores utilizando uma dose de 100 mg/kg dia (44). A mangiferina também possui atividade antibacteriana *in vivo* contra patógenos periodontais específicos como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromona gingivalis* (45).

Com base em todas estas atividades optamos por avaliar os efeitos farmacológicos da Mangiferina (xantona majoritária de *Mangifera indica*) sobre a reabsorção óssea na periodontite experimental em ratos e seus mecanismos de ação, incluindo possíveis efeitos tóxicos decorrentes de seu tratamento durante 1, 4 e 7 dias.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da Mangiferina sobre a progressão da perda óssea alveolar da doença periodontal induzida em ratos;
- Caracterizar os prováveis mecanismos de ação da Mangiferina sobre periodontite e
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da mangiferina decorrentes do seu tratamento durante 1, 4 ou 7 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Drogas

- Mangiferina (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 100 mg/kg/dia. Esta dose foi selecionada com base na sua atividade anti-reabsotiva óssea em modelo de vértebra lombar descrito por Li e colaboradores (44).
- Piroxicam (Feldene®, São Paulo, Brasil) 20 mg/kg/dia, a droga foi selecionada com base na atividade anti-reabsortiva óssea alveolar do Meloxicam (46), que é um antiinflamatório não esteroideal com efeitos semelhante ao Piroxicam. A dose do Piroxicam foi selecionada com base nas doses efetivas comercializadas para os dois medicamentos.
- Veículo (Salina = água destilada + NaCl 0,9%) 10 mL/kg/dia.

Animais

No trabalho apresentado foram utilizados 88 ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Wistar) machos, adultos, com peso médio de 180 gramas, alimentados com ração e água “*ad libitum*” provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 12 grupos de 7 animais cada e 1 grupo com 4 animais, como demonstrados nas tabelas 1 e 2. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas de acordo com os respectivos grupos experimentais. A ração e a água foram mantidas durante a experimentação.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de ratos de acordo com o tratamento proposto (o período experimental foi de 1, 4 ou 7 dias).

Nº DE RATOS POR GRUPO (n)	TRATAMENTO (1, 4 e 7 dias)
07	Tratamento com Salina 10 mL/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.
07	Tratamento com Piroxicam 20 mg/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.
07	Tratamento com Mangiferina 100 mg/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos de ratos de acordo com o tratamento proposto (o período experimental foi de 7 dias). Este experimento foi utilizado exclusivamente para a obtenção de amostras dos tecidos gengivais para dosagem de lipoxina A₄.

Nº DE RATOS POR GRUPO (n)	TRATAMENTO (7 dias)
07	Tratamento com Salina 10 mL/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.
07	Tratamento com Piroxicam 20 mg/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.
07	Tratamento com Mangiferina 100 mg/kg/dia (via oral) e doença periodontal induzida por meio da colocação da ligadura.
04	Controle sem-ligadura

Anestesia

Os animais receberam anestesia geral obtida por injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de Ketamina (Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil) e 10 mg/kg de cloridrato de Xilazina (Anasedan®, Vetbrands, SP, Brasil). Nos casos em que não se obteve a necessária profundidade do efeito anestésico desejado, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Indução da Doença Periodontal

Após os respectivos tratamentos anteriormente descritos, os animais anestesiados foram posicionados em mesa operatória apropriada a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Posteriormente ao posicionamento dos animais, foram realizados afastamentos temporários entre o primeiro e o segundo molar inferior direito, com o auxílio de uma sonda exploradora nº 5. Após o afastamento, procedeu-se a colocação da ligadura por meio de um fio de algodão de cor preta nº 24 (marca Corrente) ao redor do primeiro molar inferior direito. Os fios foram colocados ao nível do sulco gengival do primeiro molar inferior direito, e posicionado por meio de nós cirúrgicos. Esta ligadura atuou como irritante gengival e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana, conforme técnica descrita por Johnson (47). Os primeiros molares inferiores do lado esquerdo não receberam a colocação da ligadura, e serviram como o controle sem-ligadura. O tratamento prévio à indução da periodontite (1 dia) fornece um indicativo de ação preventiva sobre a instalação da doença. Este protocolo experimental foi submetido ao CEEA/IB-UNESP e foi aprovado sobre nº 43/06.

Obtenção das Lâminas Histológicas

A mandíbula de cada animal foi retirada e fixada em formol tamponado (pH 7,2) 10% durante 48 horas. Em seguida, as mandíbulas foram imersas em solução descalcificadora constituída de 50 ml de ácido fórmico a 50% e 50 mL de citrato de sódio a 20% (48) e trocadas três vezes por semana.

Após a descalcificação, as mandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescentes de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as mandíbulas foram incluídas em parafina, de forma padronizada para

obtenção de cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura no sentido vestibulo – lingual.

Análise Histométrica

As lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H.E.) e a perda óssea alveolar (POA) foi determinada pela mensuração em micrômetros (µm) da distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar na face distal dos primeiros molares inferiores, com o auxílio de um microscópio Leica DM (amplitude 5x) acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0. As POAs foram obtidas pelas diferenças dos valores do lado com ligadura (1º molar inferior direito) e do lado sem ligadura (1º molar inferior esquerdo), respeitando a variação individual de cada animal.

Contagem de Células Totais

Através das imagens capturadas das lâminas histológicas coradas com H.E. pelo programa Leica QWin Standard Versão 3.1.0., a celularidade foi determinada pelo programa AVSoft BioView seeker 4, numa área de 5 cm² de amplitude 40x, obtida na região distal dos primeiros molares inferiores.

Análise Imunohistoquímica

Foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento, que foi desparafinizada, reidratada e destinada à imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com leite desnatado e soro normal de carneiro, posteriormente à recuperação antigênica e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos (ver tabela 1) em solução de bloqueio

“overnight”. Posteriormente, a amostra foi lavada em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubada em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3`diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisada no microscópio Leica DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0., obtendo-se 3 imagens de cada lâmina que foram contadas manualmente.

Tabela 1: Anticorpos e diluições específicas para as reações imunohistoquímicas

Anticorpo	Código	Empresa	Titulação	Recuperação antigênica	Referência
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+ MW	49
COX 2	160106	Cayman Chemical	1:200*	Citrato+ MW	50
CXCR4		Novo Castra	1:300	Citrato + MW	51

*= Recomendado pela empresa

Citrato + MW = Tampão citrato 0,01 M com irradiação em forno de microondas.

PCNA (Proliferating Cell NuclearAntigen) = marcador de proliferação celular

COX-2 (cicloxigenase-2) = marcador de inflamação

CXCR4 (chemokine receptor) = marcador de angiogênese

Análise Intravital

Camundongos (Swiss, machos, 18–22 g) fornecidos pelo Instituto Butantan foram distribuídos em 2 grupos de 6 animais cada e mantidos em jejum por 2 horas. Após este período um grupo recebeu por via oral mangiferina (100 mg/Kg) e 1 hora depois todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio (Hypnol[®] Cristália; 50 mg/kg, por via intraperitoneal) e submetido a cirurgia para exposição do músculo cremaster (52). Os animais foram mantidos em uma plataforma controlada termicamente a 37°C. Uma contagem inicial dos leucócitos foi realizada e

posteriormente 1 mg de LPS foi aplicado topicamente no músculo cremaster. O número de leucócitos rolando em vênulas pós-capilares foi registrado a cada 5 minutos por um período de 30 minutos ao passarem por um ponto fixo pré-definido. O número de leucócitos aderidos à parede do endotélio por um período de 30 segundos ou mais em uma distância pré-definida de 100 μm foi avaliado a cada 5 minutos por um período de 30 minutos (53, 54). Este estudo microvascular por transiluminação de tecido foi realizado com o auxílio de um microscópio óptico (Axiolab, Carl-Zeiss, Oberkochen, DE) acoplado a uma câmera fotográfica (Coolpix 990-Nikon) usando uma abertura objetiva/numérica de distância longitudinal x10/025 e optovar 1.6.

Determinação da Concentração de Lipoxina A₄

Após 7 dias de indução da periodontite em ratos, os animais foram mortos e os tecidos gengivais circundantes aos molares inferiores foram removidos. Destes tecidos foi obtido um homogenato utilizando um macerador de tecidos (ultra-turbax® T 25 basic IKA® - Werke) e adicionado 1 mL de PBS (salina tampão fosfato) com pH 7,4 a cada amostra, as quais foram mantidas em banho-maria á temperatura de 37° C. por 20 minutos, em seguida foram centrifugadas a 9000 rpm por 25 minutos, e então extraídos os sobrenadantes que foram diluídos em 10 vezes com o tampão de extração fornecido pelo kit de ELISA BioAssay™ fornecido pela USBiological (catálogo nº L2622-20) importado pela LGC Biotecnologia. A partir destas amostras foi determinada a concentração de lipoxina A₄ utilizando o kit seguindo as recomendações do manual fornecido pelo fabricante. A concentração de lipoxina foi expressa em picogramas (pg) de lipoxina por microgramas (μg) de proteína. A quantidade de proteínas presente na amostra foi determinada pelo método de BCA segundo metodologia descrita por Smith et al. 1985 (55).

Determinação da Atividade de Metaloproteinases (MMPs)

Análise de zimografia foi utilizada para avaliar o efeito da Mangiferina sobre a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. Amostras de MMPs recombinantes (4 ng da MMP-2 e 40 pg da MMP-9) (Calbiochem, CA, USA) foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o dodecil sulfato de sódio (Bio-Rad, CA, USA), seguindo-se por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Posteriormente, os géis foram incubados overnight em tampão Tris-HCl, contendo 5 mM CaCl₂ e 1 µM ZnCl₂ e concentrações crescentes de Mangiferina (10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1 mg/mL) a 37°C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (56). As bandas foram analisadas em equipamento de captura de imagem de gel ImageQuant 300 acoplado a um software de análise de imagem ImageQuant 300 (GE Healthcare, NJ, USA). Os valores foram expressos em densidade óptica integrada.

Evolução do Peso Corporal

Os animais submetidos à doença periodontal foram pesados diariamente por 1, 4 ou 7 dias para se avaliar possíveis alterações no ganho de peso. A alteração na evolução do peso corporal é um indicativo de toxicidade sobre estes animais.

Pesos dos órgãos vitais

Após a morte dos animais, o coração, pulmões, fígado, rins e baço foram removidos e pesados (em gramas) em uma balança analítica de alta precisão. Foi feita uma relação do peso dos órgãos com o peso dos respectivos animais, e os valores obtidos desta relação foram convertidos em arcoseno para a análise estatística. A alteração nos pesos de órgãos vitais é um indicativo importante de toxicidade de uma droga sobre estes órgãos.

Avaliação Bioquímica do Soro

Amostras de sangue foram obtidas de todos os animais submetidos ao tratamento com salina, piroxicam ou mangiferina, que então foram centrifugadas e retirado o soro para determinar as dosagens séricas de uréia, creatinina, γ -GT (gama glutamiltransferase), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e glicose. Para a quantificação destes parâmetros bioquímicos séricos utilizou-se o analisador bioquímico automático Cobas Mira S[®] (Roche) e kits cinéticos e colorimétricos CELM[®], Brasil.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão (e.p.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett ou Tukey, com nível de significância mínimo de $P < 0,05$.

ARTIGO

Efeito da Mangiferina sobre o desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos.

Carvalho RR¹, Pellizzon CH², Felisbino SL², Justolin Jr LA², Vilegas W³, Lopes-Ferreira M⁴, Bruni FM⁴, Hiruma-Lima CA¹. ¹Depto. Fisiologia, Inst. Biociências, UNESP/Botucatu, SP, Brasil; ²Depto. Morfologia, Inst. Biociências, UNESP/Botucatu, SP, Brasil; ³Inst. Química, UNESP/Araraquara, SP, Brasil; ⁴Lab. Imunopatologia, Inst. Butantan, São Paulo, SP, Brasil;

Roney Rick de Carvalho

Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual Paulista,

Distrito de Rubião Junior, S/N, caixa postal 510,

Botucatu/SP – Brasil, CEP: 18618-000.

e-mail: roneyrick@hotmail.com

Palavras-chaves: periodontite; mangiferina; perda óssea alveolar; inflamação.

Resumo

Objetivos: Este trabalho visa avaliar o efeito da mangiferina (uma xantona isolada da *Mangifera indica*) sobre a perda óssea alveolar na periodontite experimental.

Métodos: A periodontite foi induzida em ratos machos Wistar (~180 g) aplicando-se uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito. Grupos de animais foram submetidos oralmente aos seguintes tratamentos: salina 10 mL/kg, piroxicam 20 mg/kg ou mangiferina 100 mg/kg. Nos dias 1, 4 ou 7 após a aplicação da ligadura, os animais foram mortos e as perdas ósseas alveolares (POAs) foram determinadas, bem como alguns parâmetros de toxicidade. Com a finalidade de elucidar os mecanismos de ação envolvidos na ação da mangiferina, avaliamos o efeito da mangiferina sobre a celularidade, expressão de COX-2, rolamento e adesão leucocitária, concentração de lipoxina A₄, atividade gelatinolítica das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, angiogênese e proliferação celular.

Resultados: A administração oral de mangiferina reduziu a POA após 1 dia (p<0,05), 4 dias (p<0,001) e 7 dias (p<0,001) de tratamentos consecutivos em animais submetidos a periodontite. Ao avaliarmos a celularidade da região lesada pela periodontite, observamos uma redução do número de células nos animais tratados com mangiferina

decorrente da ação inibitória da mangiferina sobre a enzima COX-2, sobre o rolamento e a adesão de leucócitos e também pela manutenção dos níveis normais de lipoxina A₄. A mangiferina não interferiu na atividade das MMPs 2 e 9, entretanto aumentou a angiogênese na região lesada. Os animais tratados com mangiferina apresentaram um pico de proliferação celular mais precoce e demonstrou ausência de toxicidade nos parâmetros avaliados.

Conclusão: Nossos resultados demonstraram que a mangiferina apresenta grande potencial terapêutico tanto na prevenção e no tratamento da periodontite.

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica cuja patogênese está relacionada com a formação de colônias de microorganismos presentes na placa bacteriana subgingival, incluindo algumas bactérias anaeróbias gram-negativas, bastonetes móveis, espiroquetas, assim como vírus (1-3). Esta doença também pode ser devido a alterações na resposta imunológica (4-7). Dentre os microorganismos gram-negativos indutores da periodontite, os mais importantes estão as *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus*, os quais possuem fatores de virulência que aumentam a sua infectividade e fornece condições para a sua multiplicação e persistência no periodonto (8). A presença destes microorganismos leva a formação de um biofilme dental que inicia uma resposta inflamatória no indivíduo. Esta resposta inflamatória resulta em formação de edema, infiltração de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios. A consequência final deste processo inflamatória é a formação de bolsa periodontal, destruição dos ligamentos periodontais, reabsorção óssea alveolar e perda dentária (9).

A infiltração de leucócitos é um processo de múltiplos passos, caracterizado por

sua migração (rolamento) ao sofrer a ação das quimiotaxinas, adesão às células endoteliais e transmigração através do endotélio. A interrupção de qualquer um destes passos constitui um alvo em potencial para as drogas antiinflamatórias (10-12).

Vários mediadores químicos estão envolvidos no processo inflamatório, dentre eles, as prostaglandinas, cujas principais ações são a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, favorecendo a infiltração de leucócitos e conseqüente desenvolvimento do processo inflamatório. As prostaglandinas são formadas a partir do ácido araquidônico pela ação das enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2). A COX-1 é a constitutiva e a COX-2 é a induzível, a qual é encontrada abundantemente na doença periodontal (13-15). Além das prostaglandinas, o ácido araquidônico fornece outros mediadores químicos como o leucotrieno B₄ (LTB₄) responsável pela quimiotaxia dos leucócitos, e as lipoxinas A₄ que agem como antiinflamatórios endógenos por apresentar ação antiquimiotáxica, ou seja, inibindo o rolamento de leucócitos. As lipoxinas funcionam como um “stop” da inflamação diminuindo o recrutamento de leucócitos e sua relação com a periodontite tem sido demonstrada por vários autores, sendo alvo em potencial para novas estratégias de tratamento (16, 17).

Simultaneamente a estes processos descritos anteriormente, durante a periodontite ocorre a ação das metaloproteinases (MMPs). As MMPs constituem uma importante família de enzimas que utilizam diversos componentes da matriz extracelular e membrana basal como substratos. Estas enzimas são fundamentais no crescimento, no reparo e na remodelagem dos tecidos, mas estão envolvidas também na destruição de tecidos em casos patológicos como na doença periodontal. Particularmente, as MMP-2 e -9 pertencentes ao grupo das gelatinases têm sido identificadas como predominantes tanto na periodontite em humanos como em ratos, enfatizando as suas relações com a reabsorção óssea decorrente do processo inflamatório periodontal (18-20).

Em contrapartida aos efeitos danosos do processo inflamatório, outros eventos

como a formação de novos vasos sanguíneos na região lesada (angiogênese) e a proliferação celular auxiliam na regeneração dos tecidos periodontais lesados (21, 22).

Diante de uma periodontite, diversos medicamentos, principalmente drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs) são utilizados como opção terapêutica coadjuvante para regredir os danos causados pela doença periodontal. Porém com resultados insatisfatórios devido aos diversos efeitos colaterais como lesões do trato gastrointestinal, incluindo sangramentos, perfurações, obstruções, ulcerações e doença diverticular sintomática, além de aumento no risco de infarto do miocárdio (23-26).

A Mangiferina é o componente majoritário (10%) da *Mangifera indica* L. (manga) pertencente à família Anacardiaceae. Esta planta que cresce em regiões tropicais e subtropicais é amplamente utilizada pela medicina popular para várias indicações terapêuticas (27). A mangiferina é uma xantona glicosilada (1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona-C2-beta-d-glicosada) de ocorrência natural (28), que tem sido muito descrita por possuir efeitos como imunomoduladora (29, 30), antiinflamatória ao inibir as expressões de: COX-2 (31, 32), NF- κ B (fator de transcrição nuclear-kappa B), TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa) e IL-1 (interleucina 1), todas citocinas muito importantes no processo inflamatório e na reabsorção óssea (30, 33, 34, 35). A mangiferina também inibe o LTB₄ (36). Sua atividade anti-reabsortiva óssea em modelo de vértebra lombar foi demonstrada no modelo experimental descrito por Li e colaboradores utilizando uma dose de 100 mg/kg/dia (37). Esta espécie vegetal também possui atividade antibacteriana *in vivo* contra patógenos periodontais específicos como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromona gingivalis* (38). Com base em todas estas atividades já descritas para a mangiferina, este trabalho visa avaliar os efeitos farmacológicos da Mangiferina sobre a perda óssea alveolar na periodontite experimental em ratos. Este trabalho também avalia os possíveis efeitos tóxicos.

Materiais e métodos

Drogas

Mangiferina (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 100 mg/kg/dia. Esta dose foi selecionada com base na sua atividade anti-reabsortiva óssea em modelo de vértebra lombar descrito por Li e colaboradores (35). Piroxicam (Feldene®, São Paulo, Brasil) 20 mg/kg/dia, a droga foi selecionada com base na atividade anti-reabsortiva óssea alveolar do Meloxicam (39), que é um antiinflamatório não esteroidal com efeitos semelhante ao Piroxicam. A dose do Piroxicam foi selecionada com base nas doses efetivas comercializadas para os dois medicamentos. Veículo (Salina = água destilada + NaCl 0,9%) 10 mL/kg/dia.

Animais

Foram utilizados 88 ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Wistar) machos, adultos, com peso médio de aproximadamente 180 gramas, alimentados com ração e água “*ad libitum*” provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos, os quais receberam por via oral salina, piroxicam ou mangiferina. Após o tratamento os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,08 mL/100g de peso corporal de ketamina (Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil) e 0,04 mL/100g de peso corporal de cloridrato de xilazina (Anasedan®, Vetbrands, SP, Brasil).

Indução da Doença Periodontal

Após a anestesia os animais receberam uma ligadura com um fio de algodão n° 24 (Corrente, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior direito, posicionado no nível gengival conforme método descrito por Johnson (40). Os primeiros molares

inferiores do lado esquerdo não receberam a colocação da ligadura, e serviram como o controle sem-ligadura. A ligadura foi mantida por 1, 4 ou 7 dias após a sua colocação e então os animais foram mortos por decapitação. O tratamento prévio à indução da periodontite (1 dia) fornece um indicativo de ação preventiva sobre a instalação da doença. Este protocolo experimental foi submetido ao CEEA/IB-UNESP e foi aprovado sobre nº 43/06.

Obtenção das Lâminas Histológicas

A mandíbula de cada animal foi retirada e fixada em formol tamponado (pH 7,2) 10% durante 48 horas. Em seguida, as mandíbulas foram imersas em solução descalcificadora constituída de 50 ml de ácido fórmico a 50% e 50 ml de citrato de sódio a 20% (41) e trocadas três vezes por semana.

Após a descalcificação, as mandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em série crescentes de álcoois e diafanizadas em xilol. Após a diafanização, as mandíbulas foram incluídas em parafina, de forma padronizada para obtenção de cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura no sentido vestibulo – lingual.

Análise Histométrica

As lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H.E.) e a perda óssea alveolar (POA) foi determinada pela mensuração em micrômetros (µm) da distância da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar na face distal dos primeiros molares inferiores, com o auxílio de um microscópio Leica DM (amplitude 5x) acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0. As POAs foram obtidas pelas diferenças dos valores do lado com ligadura (1º molar

inferior direito) e do lado sem ligadura (1º molar inferior esquerdo), respeitando a variação individual de cada animal.

Contagem de Células Totais

Através das imagens capturadas pelo programa Leica QWin Standard Versão 3.1.0. das lâminas histológicas coradas com H.E., a celularidade da região lesada foi determinada pelo programa AVSoft BioView seeker 4, numa área de 5 cm² de amplitude 40x, obtida na região distal dos primeiros molares inferiores.

Análise Imunohistoquímica

Foi utilizada uma lâmina representativa de cada tratamento, que foi desparafinizada, reidratada e destinada à imunohistoquímica com método de revelação para peroxidase. O bloqueio de reação inespecífica foi feito com leite desnatado e soro normal de carneiro, posteriormente à recuperação antigênica e as amostras foram incubadas com anticorpos específicos (ver tabela A) em solução de bloqueio “overnight”. Posteriormente, a amostra foi lavada em tampão fosfato (0.01 mol/L, pH 7.4) e incubada em anticorpo secundário (Kit ABC Vector) e revelado com o Avidina-Biotina associado com 3-3`diaminobenzina tetrahydrochloride (DAB, Sigma), e analisada no microscópio Leica DM acoplado com o software de captura de imagens Leica QWin Standard Versão 3.1.0., obtendo-se 3 imagens de cada lâmina que foram contadas manualmente.

Tabela A: Anticorpos e diluições específicas para as reações imunohistoquímicas.

Anticorpo	Código	Empresa	Titulação	Recuperação antigênica	Referência
PCNA	NCL-PCNA	Novo Castra	1:100	Citrato+ MW	42
COX 2	160106	Cayman Chemical	1:200*	Citrato+ MW	43
CXCR4		Novo Castra	1:300	Citrato + MW	44

*= Recomendado pela empresa

Citrato + MW = Tampão citrato 0,01 M com irradiação em forno de microondas.

PCNA (Proliferating Cell NuclearAntigen) = marcador de proliferação celular

COX-2 (cicloxigenase-2) = marcador de inflamação

CXCR4 (chemokine receptor) = marcador de angiogênese

Análise Intravital

Camundongos (Swiss, machos, 18–22 g) fornecidos pelo Instituto Butantan foram distribuídos em 2 grupos de 6 animais cada e mantidos em jejum por 2 horas. Após este período um grupo recebeu por via oral mangiferina (100 mg/Kg) e 1 hora depois todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio (Hypnol[®] Cristália; 50 mg/kg, por via intraperitoneal) e submetido a cirurgia para exposição do músculo cremaster (45). Os animais foram mantidos em uma plataforma controlada termicamente a 37°C. Uma contagem inicial dos leucócitos foi realizada e posteriormente 1 mg de LPS foi aplicado topicamente no músculo cremaster. O número de leucócitos rolando em vênulas pós-capilares foi registrado a cada 5 minutos por um período de 30 minutos ao passarem por um ponto fixo pré-definido. O número de leucócitos aderidos à parede do endotélio por um período de 30 segundos ou mais em uma distância pré-definida de 100 µm foi avaliado a cada 5 minutos por um período de 30 minutos (46, 47). Este estudo microvascular por transiluminação de tecido foi realizado com o auxílio de um microscópio óptico (Axiolab, Carl-Zeiss, Oberkochen, DE) acoplado a uma câmera fotográfica (Coolpix 990-Nikon) usando uma abertura objetiva/numérica de distância longitudinal x10/025 e optovar 1.6.

Determinação da Concentração de Lipoxina A₄ nos Tecidos

Gengivais

Após 7 dias de indução da periodontite em ratos, os animais foram mortos e os tecidos gengivais circundantes aos molares inferiores foram removidos. Destes tecidos foi obtido um homogenato utilizando um macerador de tecidos (ultra-turbax® T 25 basic IKA® - Werke) e adicionado 1 mL de PBS (salina tampão fosfato) com pH 7,4 a cada amostra, as quais foram mantidas em banho-maria á temperatura de 37° C. por 20 minutos, em seguida foram centrifugadas a 9000 rpm por 25 minutos, e então extraídos os sobrenadantes que foram diluídos em 10 vezes com o tampão de extração fornecido pelo kit de ELISA BioAssay™ fornecido pela USBiological (catálogo nº L2622-20) importado pela LGC Biotecnologia. A partir destas amostras foi determinada a concentração de lipoxina A₄ utilizando o kit seguindo as recomendações do manual fornecido pelo fabricante. A concentração de lipoxina foi expressa em picogramas (pg) de lipoxina por microgramas (µg) de proteína. A quantidade de proteínas presente na amostra foi determinada pelo método de BCA segundo metodologia descrita por Smith et al. 1985 (48).

Determinação da Atividade de Metaloproteinases (MMPs)

Análise de zimografia foi utilizada para avaliar o efeito da Mangiferina sobre a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9. Amostras de MMPs recombinantes (4 ng da MMP-2 e 40 pg da MMP-9) (Calbiochem, CA, USA) foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o dodecil sulfato de sódio (Bio-Rad, CA, USA), seguindo-se por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão Tris-

HCl 50 mM, pH 8,0. Posteriormente, os géis foram incubados overnight em tampão Tris-HCl, contendo 5 mM CaCl₂ e 1 μM ZnCl₂ e concentrações crescentes de Mangiferina (10 μg/mL, 100 μg/mL, 500 μg/mL e 1 mg/mL) a 37°C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (49). As bandas foram analisadas em equipamento de captura de imagem de gel ImageQuant 300 acoplado a um software de análise de imagem ImageQuant 300 (GE Healthcare, NJ, USA). Os valores foram expressos em densidade óptica integrada.

Evolução do Peso Corporal

Os animais submetidos à doença periodontal foram pesados diariamente por 1, 4 ou 7 dias para se avaliar possíveis alterações no ganho de peso. A alteração na evolução do peso corporal é um indicativo de toxicidade sobre estes animais.

Pesos dos órgãos vitais

Após a morte dos animais, o coração, pulmões, fígado, rins e baço foram removidos e pesados (em gramas) em uma balança analítica de alta precisão. Foi feita uma relação do peso dos órgãos com o peso dos respectivos animais, e os valores obtidos desta relação foram convertidos em arcoseno para a análise estatística. A alteração nos pesos de órgãos vitais é um indicativo importante de toxicidade de uma droga sobre estes órgãos.

Avaliação Bioquímica do Soro

Amostras de sangue foram obtidas de todos os animais submetidos ao tratamento com salina, piroxicam ou mangiferina, que então foram centrifugadas e retirado o soro para determinar as dosagens séricas de uréia, creatinina, γ -GT (gama glutamiltransferase), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e glicose. Para a quantificação destes parâmetros bioquímicos séricos utilizou-se o analisador bioquímico automático Cobas Mira S[®] (Roche) e kits cinéticos e colorimétricos CELM[®], Brasil.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão (e.p.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett ou Tukey, com nível de significância mínimo de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Efeito da Mangiferina sobre a perda óssea alveolar

Conforme a **Tabela 1**, os resultados demonstraram que após 1 dia de indução da periodontite somente o grupo de animais tratados com mangiferina foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a POA ($105,5 \pm 33,1 \mu\text{m}$) quando comparado com o grupo tratado com salina ($217,6 \pm 18,9 \mu\text{m}$). Após 4 dias de tratamento diário, tanto os animais tratados com piroxicam como aqueles tratados com mangiferina apresentaram reduzidas ($p < 0,001$) as POAs ($167,2 \pm 13,4 \mu\text{m}$; $162,2 \pm 11 \mu\text{m}$, respectivamente) quando comparados com os animais tratados com salina ($290,4 \pm 20 \mu\text{m}$). Após 7 dias de tratamento, os animais tratados com piroxicam ou mangiferina mantiveram reduzidas

($p < 0,01$; $p < 0,001$, respectivamente) as POAs ($298,5 \pm 30,9 \mu\text{m}$; $220,3 \pm 15,7 \mu\text{m}$, respectivamente) quando comparados com o grupo tratado com salina ($620,9 \pm 103,3 \mu\text{m}$).

Tabela 1. Perda óssea alveolar (em μm) em ratos submetidos à periodontite experimental e tratados com veículo (salina), piroxicam ou mangiferina.

Grupos (dose)	Duração do Tratamento		
	1 dia	4 dias	7 dias
Salina	$217,67 \pm 18,95$	$290,47 \pm 20,00$	$620,98 \pm 103,37$
Piroxicam (20 mg/kg)	$138,14 \pm 18,68$	$167,29 \pm 13,48^{***}$	$298,53 \pm 30,99^{**}$
Mangiferina (100 mg/kg)	$105,56 \pm 33,12^*$	$162,26 \pm 11,03^{***}$	$220,32 \pm 15,79^{***}$

Os valores representam a média \pm e.p. (n=7). ANOVA, seguido do teste de Tukey * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ versus o grupo Salina dentro do mesmo período experimental.

Contagem de Células Totais

Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados da contagem de células totais após 1, 4 e 7 dias de tratamento com salina, piroxicam ou mangiferina. Após 1 dia de indução da periodontite houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da celularidade dos animais tratados com salina ($221,8 \pm 4,5$ células) quando comparada com os animais do grupo controle sem-ligadura ($155,1 \pm 3,6$ células). Os animais tratados com piroxicam ou mangiferina apresentaram reduzidas significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,001$, respectivamente) as celularidades ($196 \pm 5,1$ células; $187,6 \pm 1,8$ células, respectivamente) quando comparadas com a celularidade dos animais tratados com salina. Após 4 dias de indução da periodontite a celularidade dos animais tratados com salina ($221 \pm 8,2$ células) continuou aumentada significativamente ($p < 0,001$) quando comparada com os animais do grupo controle sem-ligadura ($155,6 \pm 6,3$ células). Enquanto que os animais tratados com piroxicam ou mangiferina apresentaram reduzidas significativamente ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente) as celularidades

(191,6 ± 4,6 células; 173,8 ± 7,8 células, respectivamente) quando comparadas com as celularidades dos animais tratados com salina. Após 7 dias de indução da periodontite a celularidade dos animais tratados com salina (249,4 ± 9 células) se manteve significativamente aumentada (p<0,001) quando comparada com os animais do grupo controle sem-ligadura (153 ± 3,5 células). Tanto os animais tratados com piroxicam com aqueles tratados com mangiferina apresentaram reduzidas significativamente (p<0,001) as celularidades (204,2 ± 3 células; 181,5 ± 2,7 células, respectivamente) quando comparadas com as celularidades dos animais tratados com salina.

Tabela 2. Contagem de Células Totais em ratos com periodontite experimental.

Grupos (dose)	Duração do Tratamento		
	1 dia	4 dias	7 dias
Controle sem-ligadura	155,17 ± 3,64	155,6 ± 6,35	153 ± 3,5
Salina	221,8 ± 4,59***	221 ± 4,14***	249,4 ± 9,04***
Piroxicam (20 mg/kg)	196 ± 5,12++	191,6 ± 4,63+	204,25 ± 3,09+++
Mangiferina (100 mg/kg)	187,6 ± 1,88+++	173,8 ± 7,87+++	181,5 ± 2,78+++

Os valores representam a média ± e.p. (n=4-6). ANOVA, seguido do teste de Tukey. ***p<0,001 versus o grupo Controle sem-ligadura dentro do mesmo período experimental.

+p<0,05 ++p<0,01 +++p<0,001 versus o grupo Salina dentro do mesmo período experimental.

Análise Imunohistoquímica de COX-2

Conforme a **Tabela 3**, os resultados da análise imunohistoquímica demonstraram que os animais tratados com salina apresentaram uma tendência em aumentar a expressão de COX-2 nos dias 1 (48 células), 4 (84 células) e 7 (58 células) após a indução da periodontite quando comparados com os animais do grupo controle sem-ligadura (0 célula). Já a mangiferina apresentou uma tendência em inibir este aumento da expressão de COX-2 com presença de 33 células (1 dia), 2 células (4 dias) e 9 células (7 dias). É possível constatar também que a inibição da expressão de COX-2 promovida pela

administração de mangiferina foi mais evidente no 4º e 7º dia quando comparado aos animais tratados com salina.

Tabela 3. Análise Imunohistoquímica de COX-2 em ratos com periodontite experimental.

Grupos (dose)	Duração do Tratamento		
	1 dia	4 dias	7 dias
Controle sem-ligadura	0	0	0
Salina	48	84	58
Piroxicam (20 mg/kg)	0	3	7
Mangiferina (100 mg/kg)	33	2	9

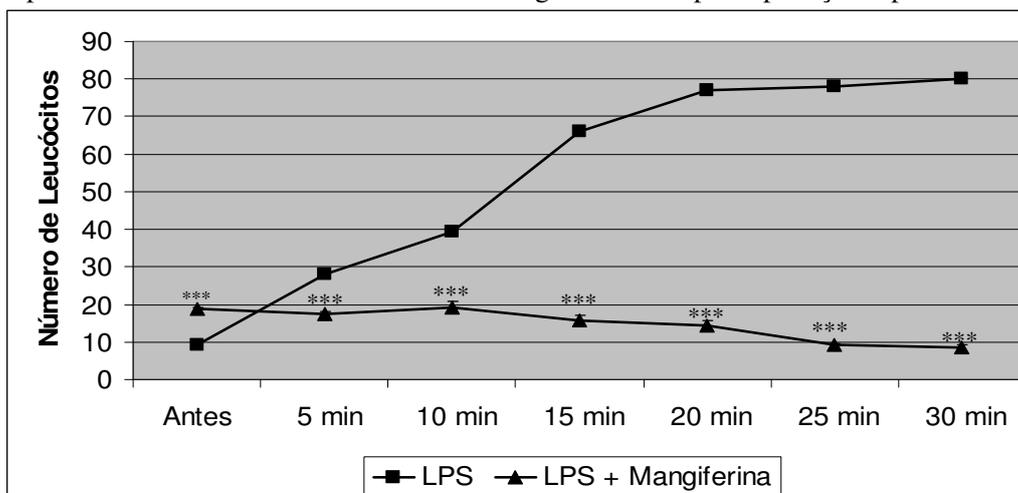
Os valores representam a somatória das células coradas de três imagens obtidas a partir de uma lâmina representativa de cada grupo.

Análise Intravital

Rolamento de Leucócitos

Como demonstrado na **Figura 1**, a mangiferina administrada previamente aos animais inibiu o rolamento de leucócitos induzido pela aplicação tópica de LPS em todos os períodos experimentais avaliados.

Figura 1. Efeito da Mangiferina sobre o Rolamento de leucócitos em vênulas pós-capilares do músculo cremaster de camundongos induzido pela aplicação tópica de LPS.

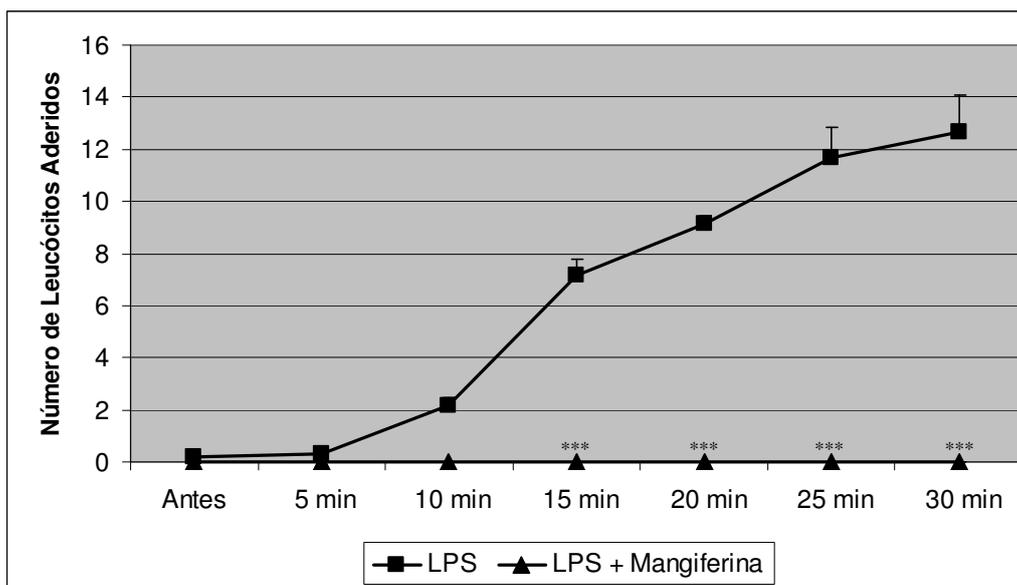


Os valores representam a média \pm e.p. (n=6). ANOVA, seguido do teste de Tukey *** p<0,001 dentro do mesmo período experimental.

Adesão de Leucócitos ao Endotélio

De acordo com a **Figura 2**, os animais tratados previamente com mangiferina apresentaram uma inibição significativa da adesão de leucócitos ao endotélio induzida pela aplicação tópica de LPS após 15, 20, 25 e 30 minutos.

Figura 2. Efeito da Mangiferina sobre a Adesão de Leucócitos ao endotélio de vênulas pós-capilares do músculo cremaster de camundongos induzido pela aplicação tópica de LPS.



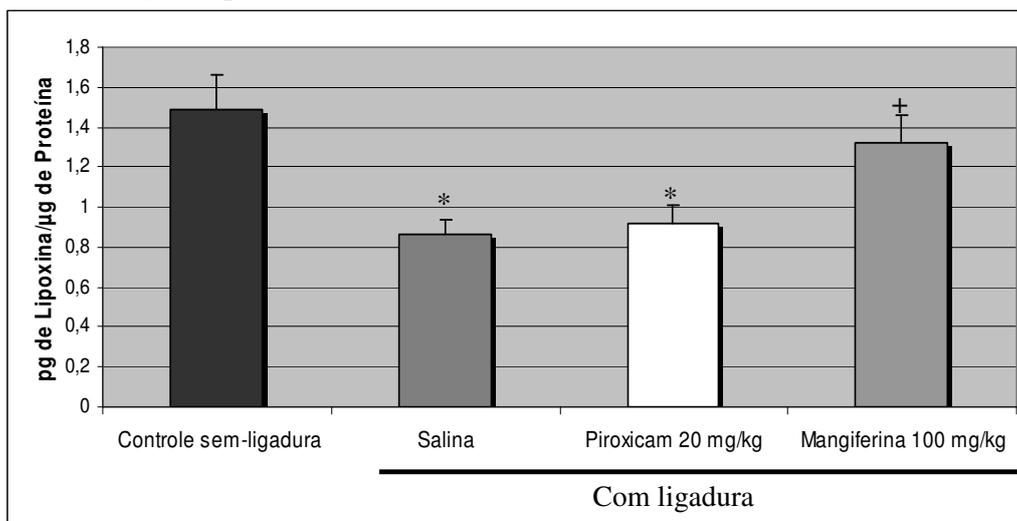
Os valores representam a média \pm e.p. (n=6). ANOVA, seguido do teste de Tukey *** $p < 0,001$ dentro do mesmo período experimental.

Determinação da Concentração de Lipoxina A₄ nos Tecidos Gengivais

Conforme demonstrado na **Figura 3**, tanto os animais tratados com salina ou piroxicam apresentaram suas concentrações de lipoxina A₄ ($0,86 \pm 0,07$ e $0,91 \pm 0,09$ pg de lipoxina/ μ g de proteína, respectivamente) reduzidas significativamente ($p < 0,05$) quando comparados com os animais do grupo controle sem-ligadura ($1,48 \pm 0,18$ pg de lipoxina/ μ g de proteína). Os animais tratados com mangiferina apresentaram suas concentrações de lipoxina A₄ aumentadas ($1,32 \pm 0,14$ pg de lipoxina/ μ g de proteína) significativamente ($p < 0,05$) quando comparados com os animais tratados com salina. Não houve diferença significativa entre os animais tratados com mangiferina e os

animais do grupo controle sem-ligadura, demonstrando que houve a manutenção dos níveis normais de lipoxina A₄ nos ratos tratados com mangiferina. Diferentemente, os animais tratados com salina ou piroxicam não foram eficazes na manutenção da normalidade dos níveis de lipoxina A₄.

Figura 3. Determinação da Concentração de Lipoxina A₄ nos Tecidos Gengivais após 7 dias de indução da periodontite em ratos.

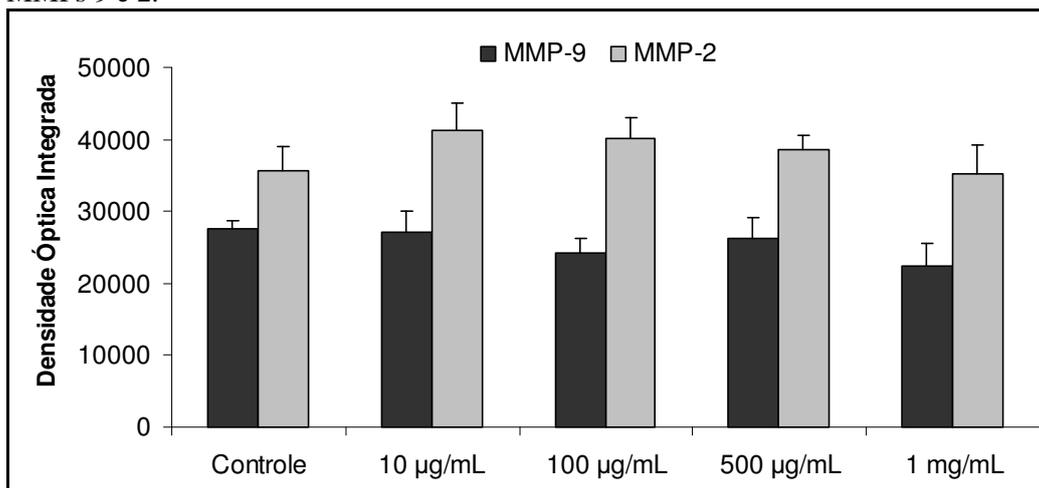


Os valores representam a média \pm e.p. (n=4-7). ANOVA, seguido do teste de Tukey. *p<0,05 versus o grupo Controle sem-ligadura; †p<0,05 versus o grupo Salina.

Determinação da Atividade de Metaloproteínases

Como demonstra na **Figura 4**, as diferentes concentrações de mangiferina não alteraram a atividade gelatinolítica das metaloproteínases 9 e 2.

Figura 4. Efeito de diferentes doses de Mangiferina sobre a atividade gelatinolítica das MMPs 9 e 2.



Os valores representam a média \pm e.p. (n=6-7). ANOVA, seguido do teste de Dunnett versus o grupo controle.

Análise Imunohistoquímica de Angiogênese

Conforme a **Tabela 4**, os resultados demonstraram que os animais tratados com salina não apresentaram uma tendência em aumentar a formação de novos vasos sanguíneos após 1 (8 vasos), 4 (9 vasos) e 7 (14 vasos) dias de indução da periodontite quando comparados com os animais do grupo controle sem-ligadura (10 vasos), (6 vasos) e (15 vasos) respectivamente. Em contrapartida, os animais tratados com mangiferina apresentaram uma tendência de aumento da angiogênese após 1 (14 vasos), 4 (27 vasos) e 7 (38 vasos) dias da indução da periodontite em ratos quando comparados com os animais tratados com salina.

Tabela 4. Análise Imunohistoquímica de Angiogênese em ratos com periodontite experimental.

Grupos (dose)	Duração do Tratamento		
	1 dia	4 dias	7 dias
Controle sem-ligadura	10	6	15
Salina	8	9	14
Piroxicam (20 mg/kg)	13	29	26
Mangiferina (100 mg/kg)	14	27	38

Os valores representam a somatória das células coradas de três imagens obtidas a partir de uma lâmina representativa de cada grupo.

Análise Imunohistoquímica de PCNA

Conforme a **Tabela 5**, os animais tratados com salina e mangiferina apresentaram uma tendência de aumento da proliferação de células nos dias 4 (48 e 88 células respectivamente) e 7 (98 e 72 células respectivamente) após a indução da periodontite quando comparados com os animais do grupo controle sem-ligadura (23 células) e (37 células) respectivamente. Os animais tratados com mangiferina apresentaram um aumento mais evidente após 4 dias de tratamento, o que demonstra um início de reparo e cicatrização mais precoce quando comparado com os animais tratados com salina ou mesmo quando comparado aos animais tratados com piroxicam.

Tabela 5. Análise Imunohistoquímica de PCNA em ratos com periodontite experimental.

Grupos (dose)	Duração do Tratamento		
	1 dia	4 dias	7 dias
Controle sem-ligadura	0	23	37
Salina	0	48	98
Piroxicam (20 mg/kg)	0	69	90
Mangiferina (100 mg/kg)	0	88	72

Os valores representam a somatória das células coradas de três imagens obtidas a partir de uma lâmina representativa de cada grupo.

Evolução do Peso Corporal

Não houve alterações na evolução do peso corporal dos animais submetidos à doença periodontal por 1, 4 ou 7 dias e tratados com salina, piroxicam ou mangiferina.

Pesos dos Órgãos Vitais

Conforme a **Tabela 6**, os resultados demonstraram que os animais tratados com piroxicam ou mangiferina não apresentaram alterações significativas nos pesos dos órgãos após 1, 4 e 7 dias de indução da periodontite quando comparado aos animais que receberam apenas o veículo. A análise destes dados, não indicou efeitos tóxicos aparentes sobre estes órgãos.

Tabela 6. Pesos dos Órgãos após 1, 4 e 7 dias de indução da periodontite em ratos e tratados com veículo (salina), piroxicam ou mangiferina.

Duração	Tratamento (dose)	Coração	Pulmões	Fígado	Rins	Baço
1 dia	Salina	3,72 ± 0,01	4,37 ± 0,05	12,63 ± 0,13	5,30 ± 0,02	3,60 ± 0,08
	Piroxicam (20 mg/kg)	3,70 ± 0,04	4,50 ± 0,06	12,14 ± 0,17	5,27 ± 0,04	3,53 ± 0,07
	Mangiferina (100 mg/kg)	3,72 ± 0,03	4,47 ± 0,06	12,16 ± 0,16	5,22 ± 0,04	3,40 ± 0,07
4 dias	Salina	3,82 ± 0,04	4,74 ± 0,14	12,29 ± 0,24	5,30 ± 0,04	3,63 ± 0,08
	Piroxicam (20 mg/kg)	3,95 ± 0,08	5,05 ± 0,14	12,50 ± 0,09	5,31 ± 0,06	3,60 ± 0,06
	Mangiferina (100 mg/kg)	3,96 ± 0,05	4,97 ± 0,19	11,96 ± 0,07	5,36 ± 0,05	3,56 ± 0,07
7 dias	Salina	3,65 ± 0,07	4,42 ± 0,06	11,62 ± 0,19	5,18 ± 0,05	3,15 ± 0,14
	Piroxicam (20 mg/kg)	4,17 ± 0,27	4,82 ± 0,34	11,80 ± 0,13	5,32 ± 0,04	3,32 ± 0,05
	Mangiferina (100 mg/kg)	3,83 ± 0,05	4,22 ± 0,06	11,68 ± 0,11	5,07 ± 0,04	3,11 ± 0,08

Média ± e.p. (arcoseno), (n=6-7). ANOVA, seguido do teste de Dunnett versus Salina dentro do mesmo período experimental. P>0.05.

Análises Bioquímicas

Os resultados demonstraram (**Tabela 7**) uma redução significativa ($p < 0,01$) nos níveis de AST nos dias 1 ($204,43 \pm 7,78$ u/L) e 4 ($220,4 \pm 9,25$ u/L) após a indução da periodontite dos animais tratados com mangiferina quando comparados com os animais tratados com salina ($256,86 \pm 5,91$ u/L) e ($280,14 \pm 8,48$ u/L) respectivamente. Após 7 dias de indução da periodontite não houve alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados.

Tabela 7. Análises bioquímicas séricas após 1, 4 e 7 dias de tratamento com salina, piroxicam ou mangiferina de ratos submetidos à periodontite.

	Uréia	Creatinina	Gama-GT	ALT	AST	Glicose
1 dia	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
Salina	36,14±3,00	0,39±0,01	14,85±3,85	70,14±2,12	256,86±5,91	70,57±4,63
Piroxicam	34,57±2,12	0,43±0,01	21,57±4,14	79,57±3,49	235,43±6,02	85,57±2,67
Mangiferina	29,28±2,39	0,38±0,01	17,85±5,33	68,57±5,19	204,43±7,78**	84,57±5,85
4 dias						
Salina	35,57±1,88	0,4±0,03	12,57±4,29	94,57±6,89	280,14±8,48	76,71±5,30
Piroxicam	35,42±2,28	0,37±0,01	23,85±6,60	77,14±7,18	247,7±13,26	81,85±2,87
Mangiferina	31±0,75	0,35±0,00	10,71±4,78	93,28±3,68	220,4±9,25**	88,14±2,72
7 dias						
Salina	36,16±2,45	0,41±0,01	23±8,48	87,16±2,42	252±17,50	92,83±1,24
Piroxicam	34,14±3,81	0,39±0,01	41,28±7,64	85,71±8,28	239,86±34,40	88,42±5,81
Mangiferina	31,71±1,68	0,37±0,00	26,14±6,28	87,57±3,58	203,29±15,47	103,43±2,75

Os valores representam a média \pm e.p. ($n=6-7$). ANOVA, seguido do teste de Dunnett
** $p < 0,01$ versus Salina dentro do mesmo período experimental.

DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que leva a perda de osso alveolar (9), e pode ser induzida em ratos de forma reproduzível (50). Estudos anteriores têm propalado a ação antireabsortiva óssea de mangiferina (100 mg/kg) em modelo de vértebra lombar (37). Neste trabalho nos propomos a avaliar o efeito desta mesma concentração de mangiferina sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos. Como a mangiferina foi administrada previamente à indução da periodontite, podemos afirmar que ela apresentou um efeito preventivo na instalação da

doença periodontal ao demonstrar uma redução significativa da POA após 1 dia da indução nos animais tratados com mangiferina quando comparados com os animais tratados com salina. E também apresentou um efeito protetor sobre a doença periodontal já instalada ao reduzir significativamente a POA após 4 e 7 dias da indução nos animais tratados com mangiferina quando comparados com os animais tratados com salina (Tabela 1).

Ao considerarmos que a POA é decorrente de um processo inflamatório, e o recrutamento de células de defesa é uma das características principais deste processo que resulta numa grande quantidade de células no local inflamado (46), optamos por realizar a quantificação das células presentes nesta região. Constatamos em nossos resultados que os animais tratados com mangiferina apresentaram uma quantidade de células significativamente reduzidas quando comparado com os animais tratados com salina (Tabela 2). Estes resultados demonstraram que houve um menor recrutamento de células de defesa nos animais tratados com mangiferina.

O recrutamento de células está diretamente relacionado com a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, e estes efeitos são em grande parte resultado da ação das prostaglandinas, as quais são sintetizadas a partir das enzimas ciclooxigenases 1-constitutiva e 2-induzida (COX-1 e COX-2 respectivamente) (14, 15). A COX-2 induzida é abundantemente encontrada na periodontite (13), e nossos resultados demonstraram uma tendência em inibir a COX-2 nos animais tratados com mangiferina quando comparado com os animais tratados com salina (Tabela 3). Estes dados estão em concordância com a literatura na qual já foi demonstrada a ação inibitória da COX-2 pela mangiferina em outros modelos experimentais (32, 33).

Dentre as células de defesa recrutadas para o processo inflamatório da periodontite podemos destacar os leucócitos. Estas células ao serem atraídas pela ação de quimiotaxinas aumentam o seu rolamento através dos vasos sanguíneos e se aderem

ao endotélio com a finalidade de atravessá-lo, indo em direção ao sítio da inflamação (10-12). Portanto, o rolamento e a adesão leucocitária ao endotélio constituem parâmetros importantes para se avaliar o mecanismo de ação de substâncias antiinflamatórias, como é o caso da mangiferina. Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com mangiferina apresentaram uma inibição significativa do rolamento e da adesão leucocitária ao endotélio quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 1 e 2 respectivamente). A inibição da adesão de leucócitos ao endotélio demonstrada em nossos resultados confirmam os dados de literatura sobre a inibição da expressão de várias moléculas de adesão como as ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ELAM-1 e VCAM-1 promovida pela mangiferina (31, 51).

Como dito anteriormente, o rolamento é estimulado pela ação de quimiotaxinas, como o leucotrieno B₄ (LTB₄) e inibido pela ação de mediadores anti quimiotáticos como as lipoxinas A₄ (LXA₄) (16, 17). O efeito inibitório da mangiferina sobre o LTB₄ já foi demonstrado na literatura (36), entretanto não existem relatos do efeito da mangiferina sobre a LXA₄. Nossos resultados demonstraram que tanto os animais tratados com salina como aqueles tratados com piroxicam apresentaram seus níveis de lipoxina A₄ reduzidos significativamente quando comparados com os animais sem ligadura. Já os animais tratados com mangiferina apresentaram seus níveis de lipoxina A₄ aumentados significativamente quando comparados com os animais tratados com salina, e sem diferença significativa quando comparados com os animais sem ligadura (Figura 3). Nossos resultados demonstraram que a administração de mangiferina manteve os níveis normais de LXA₄ nos animais. Portanto, a ação conjunta da mangiferina sobre o LTB₄ e sobre a LXA₄, demonstrado neste trabalho, confirmam a ação anti quimiotática da mangiferina sobre o rolamento de leucócitos. Esta manutenção dos níveis normais de LXA₄ não foi demonstrada pelos animais tratados com piroxicam.

Sabe-se que as MMPs 2 e 9 são abundantemente encontradas na periodontite e estão

envolvidas na reabsorção óssea alveolar (18-20), avaliamos o efeito da mangiferina sobre a atividade destas enzimas, entretanto nossos resultados demonstraram que não houve uma redução na atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 (Figura 4). Por outro lado não podemos descartar uma possível ação inibitória da mangiferina sobre a expressão destas enzimas, uma vez que já existem relatos da ação da mangiferina nas citocinas TNF-alfa e IL-1 (27, 31, 34, 35), as quais apresentam a capacidade de ativar as expressões das MMPs (52, 53).

Se por um lado está ocorrendo processos inflamatórios que conduzem a destruição dos tecidos periodontais como a reabsorção óssea alveolar, por outro lado, eventos como a formação de novos vasos (angiogênese) e a proliferação celular são eventos importantes para a recuperação desta área lesada (21, 22). Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com mangiferina apresentaram uma tendência ao aumento da angiogênese quando comparados com os animais tratados com salina, e a um pico de proliferação celular mais precoce quando comparado com os animais tratados com salina ou piroxicam (Tabela 4 e 5 respectivamente). Portanto estes resultados indicaram que os animais tratados com mangiferina apresentaram uma aceleração no processo de reparo e cicatrização dos tecidos periodontais lesados pelo processo inflamatório.

Sabe-se há muito tempo que as drogas antiinflamatórias não esteroidais, assim como o piroxicam apresentam graves efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal (24-26), além de aumentarem o risco de infarto do miocárdio (23).

A administração de mangiferina na dose de 100 mg/kg/dia não apresentou efeitos tóxicos aparentes nos períodos experimentais descritos com relação aos parâmetros séricos, peso dos órgãos (Tabela 6 e 7) e evolução do peso corporal. A diminuição dos níveis de AST provocados pela mangiferina (Tabela 7) são indícios de efeito hepatoprotetor, confirmando os dados da literatura (54) sobre este produto

natural.

Apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre a redução da perda óssea alveolar promovida pela mangiferina e a promovida pelo piroxicam, a mangiferina possui uma grande vantagem ao demonstrar efeito gastroprotetor (55), o que não ocorre com o piroxicam.

Nossos resultados claramente demonstraram que a mangiferina reduz a perda óssea alveolar em ratos submetidos à periodontite experimental, e que seu mecanismo de ação está relacionado à sua ação antiinflamatória e a sua capacidade de acelerar o processo de reparo e cicatrização das áreas lesadas. Estes dados caracterizam a mangiferina como um grande potencial terapêutico tanto na prevenção como no tratamento da periodontite.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projeto Biota-FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior).

Referências

1. Socransky, SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease. *J Periodont* 1992; 63 (4): 322-331.
2. Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 399-413.
3. Kamma JJ, Slots J. Herpes virus-bacterial interaction in aggressive periodontitis. *J Clin Periodont* 2003; 30: 420-426.
4. Breivik T, Rook GA. Prevacination with SRL172 (heat-killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 463-467.
5. Breivik T, Rook GA. Treatment with SRL172 (Heat-killed *Mycobacterium*

- vaccae) inhibits progression of established experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Periodont Res* 2002; 37: 210-214.
6. Breivik T, Rook GA. Oral treatment with SR299 (killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Clin Periodont* 2003; 30: 931-936.
 7. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 166-174.
 8. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Dent Res* 2003; 82(2): 82-90.
 9. Lima V, Bezerra MM, Alencar VBM, et al. Effects of clorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 123-129.
 10. Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, et al. Sequential Contribution of L- and P-selectin to Leukocyte Rolling In Vivo. *J Exp Med* 1995; 181: 669-675.
 11. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. In: Leendert CP. *Adhesion Molecules in Health and Disease*. CRC Press 1997: 1-54.
 12. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; 63 (Jan): 1-14.
 13. Lohinai Z, Stachlewitz R, Székely AD, Fehér E, Dézsi L, Szabó C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life Sciences* 2001; 70: 279-290.
 14. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38: 97-120.
 15. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2 regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50: 1535-1542.
 16. Kantarci A, Dyke TEV. Lipoxin signaling in neutrophils and their role in periodontal disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 289-299.
 17. Romano M. Lipoxin analogs and lipoxin formation in vivo. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 239-243.

18. Lorencini M. Modificações teciduais e expressão de metaloproteinases de matriz e do inibidor reek na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 84 pg. Dissertação.
19. Rodini CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (Inos) e metaloproteinases -2 e -9. Bauru, SP: Universidade de São Paulo, 2005. 165 pg. Dissertação.
20. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP, Karimbux NY. Membrane Type (MT)1-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MMP-2 Expression in Ligature-Induced Periodontitis in the Rat. *Journal of Periodontology* 2003; 74(4): 494-500.
21. Cochran DL, Wosney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000, 1999; 19: 40-58.
22. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H et al. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 491-502.
23. Johnsen SP, Larsson H, Tarone RE et al. Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs. *Arch Intern Med* 2005; 165: 978-984.
24. Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology* 2001;120: 594-606.
25. Laine L, Connors LG, Reicin A, et al. Serious lower gastrointestinal clinical events with nonselective NSAID or coxib use. *Gastroenterology* 2003; 124: 288-292.
26. Langman MJS, Morgan L, Worrall A. Use of anti-inflammatory drugs by patients admitted with small or large bowel perforations and haemorrhage. *Br Med J* 1985; 290: 347-349.
27. Coe FG, Anderson GJ. Screening of medicinal plants used by the garifuna of eastern nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 1996; 53: 29-50.
28. Andreu GP, Delgado R, Velho JA, Curti C, Vercesi AE. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺ - citrate. *European Journal of Pharmacology* 2005; 513: 47-55.

29. Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* 1996; 42: 443-451.
30. Leiro J, Arranz JA, Yáñez M, Ubeira FM, Sanmartín ML, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *International Immunopharmacology* 2004; 4: 763-778.
31. Beltrán AE, Alvarez Y, Xavier FE et al. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *European Journal of Pharmacology* 2004; 499: 297– 305.
32. Leiro J, Garcia D, Arranz JA, Delgado R, Sanmartín ML, Orallo F. An Anacardiaceae preparation reduces the expression of inflammation-related genes in murine macrophages. *International Immunopharmacology* 2004; 4: 991–1003.
33. Leiro JM, Alvarez E, Arranz JA, Siso IG, Orallo F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alfa and transforming growth factor-beta genes. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 1361-1371.
34. Sarkar A, Sreenivasan Y, Ramesh GT, Manna SK. Beta-D-Glucoside Suppresses Tumor Necrosis Factor-induced Activation of Nuclear Transcription Factor kapa-B but Potentiates Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(32): 33768-33781.
35. Garrido G, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG®) Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacological Research* 2004; 50: 165–172.
36. Garrido G, González D, Lemus Y, Delporte C, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANGs) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine* 2006; 13: 412–418.
37. Li H, Miyahara T, Tezuka Y, et al. The effect of Kampo formulae on bone resorption in vitro and in vivo. I. Active constituents of Tsu-kan-gan. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 1322-1326.

38. Bairy I, Reeja S, Siddharth, Rao PS, Bhat M, Shivananda PG. Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microglora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol* 2002; 45(3): 307-310.
39. Nassar CA, Nassar PO, Nassar PM, Spolidorio LC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. *Braz Oral Res* 2005; 19(1): 36-40.
40. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran and sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975; 10: 332-45.
41. Anna-Morse, MS. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone sectioning in paraffin. *J Dent Res* 1945; 24(3): 143-153.
42. Kitajima EW, Rodrigues CH, Silveira JS, et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with Meleira (Sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatol. Brasil* 1993; 18: 118-122.
43. Berenguer B, Alarcon de La Lastra C, Moreno FJ, Martin MJ. Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2002; 442: 125–135.
44. Akimoto M, Hashimoto H, Shigemoto M, Maeda A, Yamashita K. Effects of antisecretory agents on angiogenesis during healing of gastric ulcers. *J gastroenterol* 2005; 40: 685-689.
45. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973; 5: 384-394.
46. Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, et al. Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during Inflammation. *The Journal of Immunolog* 2005; 174: 6406–6415.
47. Wong J, Johnston B, Lee SS, et al. A Minimal Role for Selectins in the Recruitment of Leukocytes into the Inflamed Liver Microvasculature. *J Clin Invest* 1997; 99: 2782–2790.
48. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH. Measurement of protein using BCA. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
49. Jung K, Lein M, Ulbrich N, et al. Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostatic tissue: Analytical aspects. *The Prostate* 1998; 34: 130-136.
50. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991; 62: 59-73.

51. Beltran Nunez AE, Ledon Naranjo N, Romay Penabad C, et al. VIMANG® y mangiferina inhiben la expresión de ICAM-1 en células endoteliales estimuladas con citocinas proinflamatorias. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2003; 22(3): 164-172.
52. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate Expression of Stromelysin, Collagenase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Rheumatoid Human Synovial Fibroblasts. Synergistic Effects of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α on Stromelysin Expression. *Biol Chem* 1990; 265(28): 17238-17245.
53. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1993; 4(2): 197-250.
54. Yoshikawa M, Ninomiya K, Shimoda H, Nishida N, Matsuda H. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: Preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(1): 72-76.
55. Carvalho AC, Guedes MM, de Souza AL, et al. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Planta Med* 2007; 73(13): 1372-1376.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

- 1) A mangiferina reduziu a perda óssea alveolar após 1, 4 ou 7 dias de indução da periodontite em ratos;
- 2) A mangiferina reduziu a quantidade de células totais presentes nas regiões afetadas pela periodontite;
- 3) A mangiferina reduziu a expressão de COX-2 nas regiões afetadas pela periodontite;
- 4) A mangiferina inibiu o rolamento e a adesão de leucócitos ao endotélio de vênulas pós-capilares de camundongos;
- 5) A mangiferina manteve os níveis normais de lipoxina A₄ nos tecidos gengivais de ratos submetidos à periodontite experimental;
- 6) A mangiferina não reduziu a atividade gelatinolítica das metaloproteinases 2 e 9.
- 7) A mangiferina aumentou a formação de vasos sanguíneos e antecipou o pico de proliferação celular nas regiões afetadas pela periodontite e
- 8) A mangiferina não apresentou efeitos tóxicos aparentes decorrentes de seu tratamento durante 1, 4 ou 7 dias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Galvão PA, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17 (1): 56-62.
2. Page RC. The etiology and pathogenesis of periodontitis. *Compend Contin Educ Dent* 2002; 23 (5): 11-14.
3. Socransky, SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease. *J Periodont* 1992; 63 (4): 322-331.
4. Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 399-413.
5. Kamma JJ, Slots J. Herpes virus-bacterial interaction in aggressive periodontitis. *J Clin Periodont* 2003; 30: 420-426.
6. Breivik T, Rook GA. Pre vaccination with SRL172 (heat-killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 463-467.
7. Breivik T, Rook GA. Treatment with SRL172 (Heat-killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits progression of established experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Periodont Res* 2002; 37: 210-214.
8. Breivik T, Rook GA. Oral treatment with SR299 (killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. *J Clin Periodont* 2003; 30: 931-936.
9. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 166-174.
10. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Dent Res* 2003; 82(2): 82-90.
11. Lima V, Bezerra MM, Alencar VBM, et al. Effects of clorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 123-129.
12. Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, et al. Sequential Contribution of L- and P-selectin to Leukocyte Rolling In Vivo. *J Exp Med* 1995; 181: 669-675.

13. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. In: Leendert CP. Adhesion Molecules in Health and Disease. CRC Press 1997: 1-54.
14. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; 63 (Jan): 1-14.
15. Lohinai Z, Stachlewitz R, Székely AD, Fehér E, Dézsi L, Szabó C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life Sciences* 2001; 70: 279-290.
16. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38: 97-120.
17. Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2 regulation and relevance in inflammation. *Biochemical Pharmacology* 1995; 50: 1535-1542.
18. Kantarci A, Dyke TEV. Lipoxin signaling in neutrophils and their role in periodontal disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 289-299.
19. Romano M. Lipoxin analogs and lipoxin formation in vivo. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005; 73: 239-243.
20. Lorencini M. Modificações teciduais e expressão de metaloproteinases de matriz e do inibidor reek na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 84 pg. Dissertação.
21. Rodini CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (Inos) e metaloproteinases -2 e -9. Bauru , SP: Universidade de São Paulo, 2005. 165 pg. Dissertação.
22. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP, Karimbux NY. Membrane Type (MT)1-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MMP-2 Expression in Ligature-Induced Periodontitis in the Rat. *Journal of Periodontology* 2003; 74(4): 494-500.
23. Cochran DL, Wosney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000, 1999; 19: 40-58.
24. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H et al. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 491-502.

25. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991; 62: 59-73.
26. Klausen B, Hougen HP. Quantitative studies of lymphoid organs, blood and lymph in inbred athymic and euthymic LEW rats under germfree and specified-pathogen-free conditions. *Laboratory Animals* 1987; 21: 342-347.
27. Johnsen SP, Larsson H, Tarone RE et al. Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs. *Arch Intern Med.* 2005;165: 978-984.
28. Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology* 2001; 120: 594-606.
29. Laine L, Connors LG, Reicin A, et al. Serious lower gastrointestinal clinical events with nonselective NSAID or coxib use. *Gastroenterology* 2003; 124: 288-292.
30. Langman MJS, Morgan L, Worrall A. Use of anti-inflammatory drugs by patients admitted with small or large bowel perforations and haemorrhage. *Br Med J* 1985; 290: 347-349.
31. CAPES/PROIN/CCS. Das plantas medicinais aos fitoterápicos - abordagem multidisciplinar 1997.
32. Monge A. Patentes e contratos no descobrimento de medicamento nos países em desenvolvimento: uma reflexão da perspectiva do investigador. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Editora Argos, 2001: 335-349.
33. Souza-Brito ARM, NUNES DS. Ethnopharmacology and sustainable development of new plant-derived drugs. *Ciência e Cultura* 1997; 49(1/2): 402-412.
34. Di-Stasi LC. *Plantas medicinais: Arte e Ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora UNESP 1996.
35. Gilbert B, Ferreira JLP, Alves LF. *Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas*. Curitiba: Abifito, 2005.
36. Coe FG, Anderson GJ. Screening of medicinal plants used by the garifuna of eastern nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 1996; 53: 29-50.
37. Andreu GP, Delgado R, Velho JA, Curti C, Vercesi AE. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits

- mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺ - citrate. *European Journal of Pharmacology* 2005; 513: 47-55.
38. Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* 1996; 42: 443-451.
 39. Leiro J, Arranz JA, Yáñez M, Ubeira FM, Sanmartín ML, Orallo F. . Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *International Immunopharmacology* 2004; 4: 763-778.
 40. Leiro JM, Alvarez E, Arranz JA, Siso IG, Orallo F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alfa and transforming growth factor-beta genes. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 1361-1371.
 41. Beltrán AE, Alvarez Y, Xavier FE et al. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *European Journal of Pharmacology* 2004; 499: 297– 305.
 42. Garrido G, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG®) Role of mangiferin isolated from the extract. *Pharmacological Research* 2004; 50: 165–172.
 43. Garrido G, González D, Lemus Y, Delporte C, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANGs) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine* 2006; 13: 412–418.
 44. Li H, Miyahara T, Tezuka Y, et al. The effect of Kampo formulae on bone resorption in vitro and in vivo. I. Active constituents of Tsu-kan-gan. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 1322-1326.
 45. Bairy I, Reeya S, Siddharth, Rao PS, Bhat M, Shivananda PG. Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microglora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol* 2002; 45(3): 307-310.
 46. Nassar CA, Nassar PO, Nassar PM, Spolidorio LC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. *Braz Oral Res* 2005; 19(1): 36-40.
 47. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran and sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res* 1975; 10: 332-45.

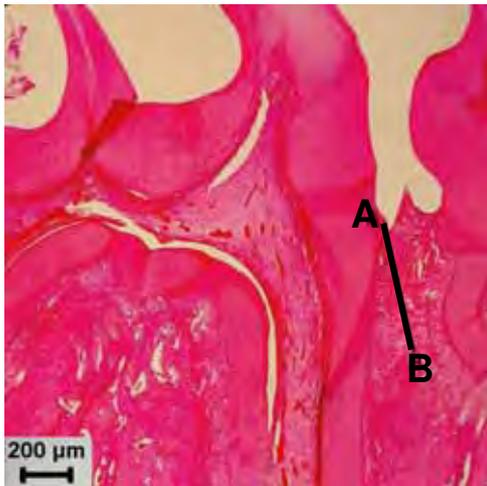
48. Anna-Morse, MS. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone sectioning in paraffin. *J Dent Res* 1945; 24(3): 143-153.
49. Kitajima EW, Rodrigues CH, Silveira JS, et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with Meleira (Sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). *Fitopatol. Brasil* 1993; 18: 118-122.
50. Berenguer B, Alarcon de La Lastra C, Moreno FJ, Martin MJ. Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2002; 442: 125–135.
51. Akimoto M, Hashimoto H, Shigemoto M, Maeda A, Yamashita K. Effects of antisecretory agents on angiogenesis during healing of gastric ulcers. *J gastroenterol* 2005; 40: 685-689.
52. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973; 5: 384-394.
53. Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, et al. Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during Inflammation. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 6406–6415.
54. Wong J, Johnston B, Lee SS, et al. A Minimal Role for Selectins in the Recruitment of Leukocytes into the Inflamed Liver Microvasculature. *J Clin Invest* 1997; 99: 2782–2790.
55. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH. Measurement of protein using BCA. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
56. Jung K, Lein M, Ulbrich N, et al. Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostatic tissue: Analytical aspects. *The Prostate* 1998; 34: 130-136.

APÊNDICE

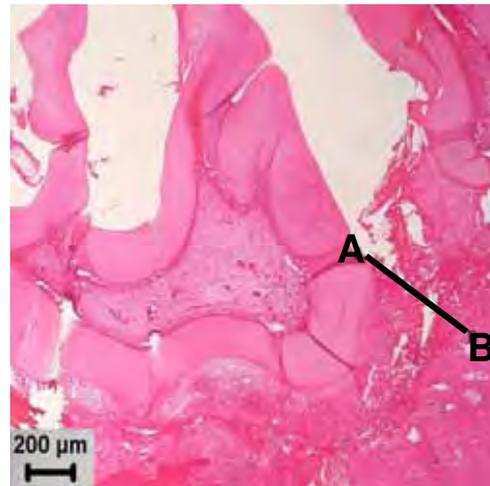
APÊNDICE

Perda Óssea Alveolar

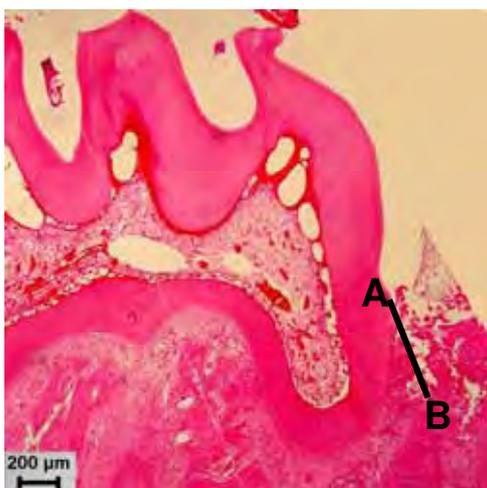
As imagens representam a Perda Óssea Alveolar na distal dos primeiros molares inferiores após 1 dia da indução da periodontite em ratos, a qual foi determinada pela medida da junção cimento-esmalte (A) à crista óssea alveolar (B). As medidas aqui representadas são apenas ilustrativas.



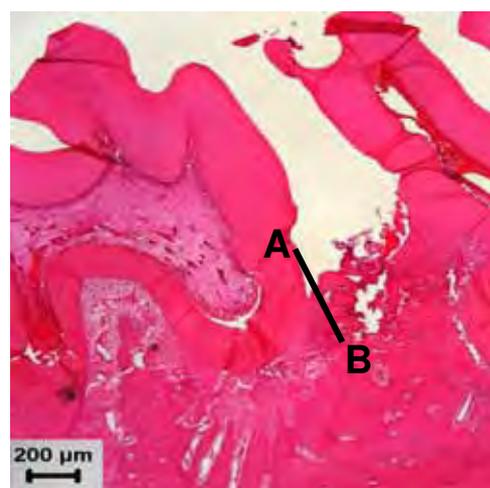
Medida Basal



Salina

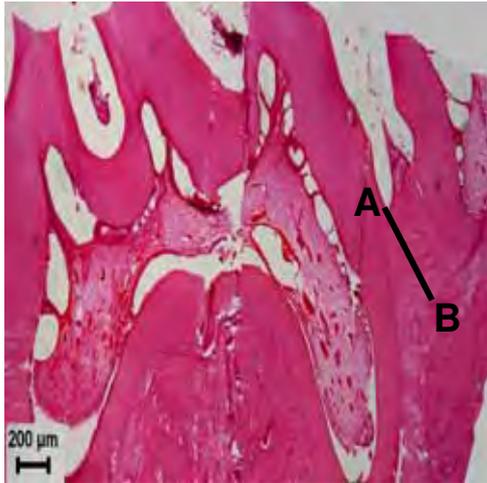


Piroxicam

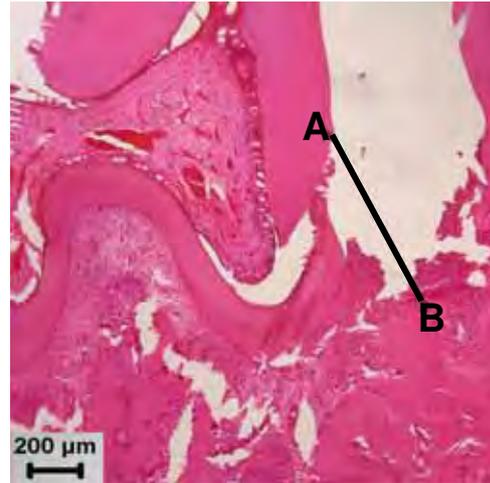


Mangiferina

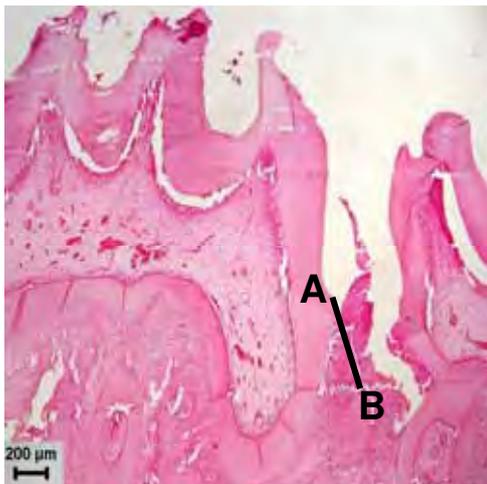
As imagens representam a Perda Óssea Alveolar na distal dos primeiros molares inferiores após 4 dias da indução da periodontite em ratos, a qual foi determinada pela medida da junção cimento-esmalte (A) à crista óssea alveolar (B). As medidas aqui representadas são apenas ilustrativas.



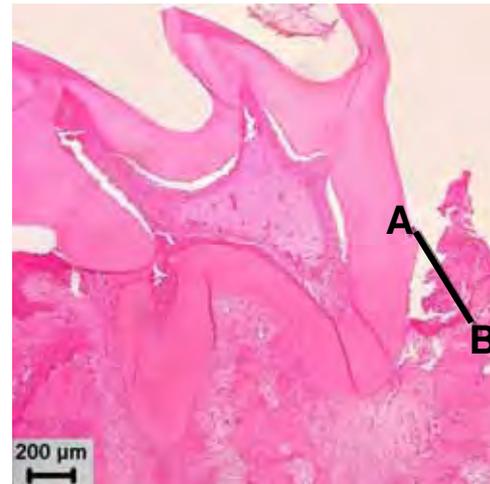
Medida Basal



Salina

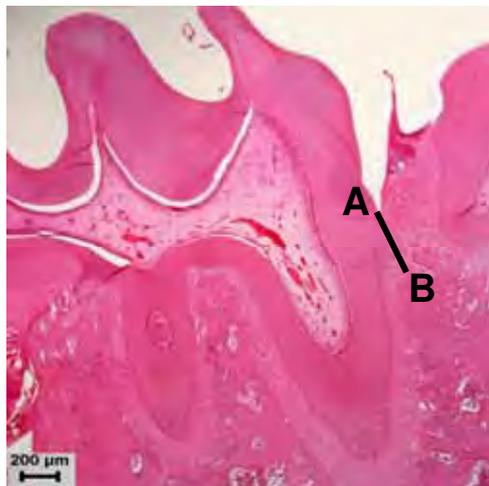


Piroxicam

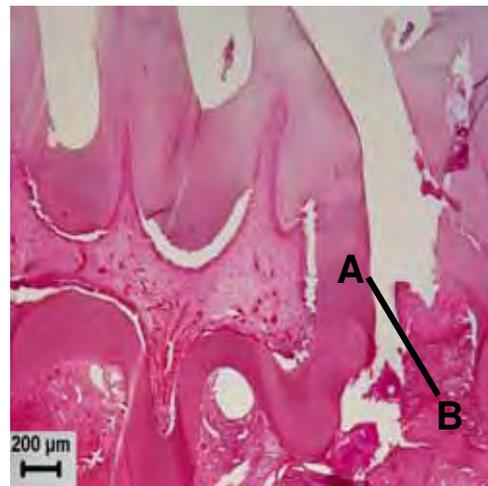


Mangiferina

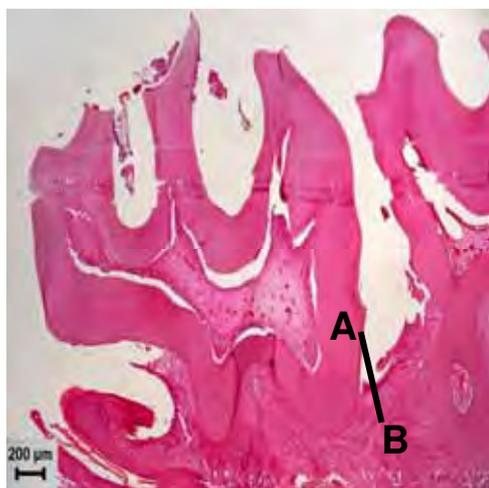
As imagens representam a Perda Óssea Alveolar na distal dos primeiros molares inferiores após 7 dias da indução da periodontite em ratos, a qual foi determinada pela medida da junção cimento-esmalte (A) à crista óssea alveolar (B). As medidas aqui representadas são apenas ilustrativas.



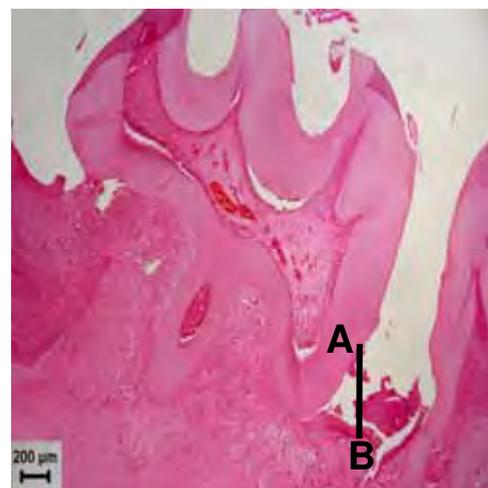
Medida Basal



Salina



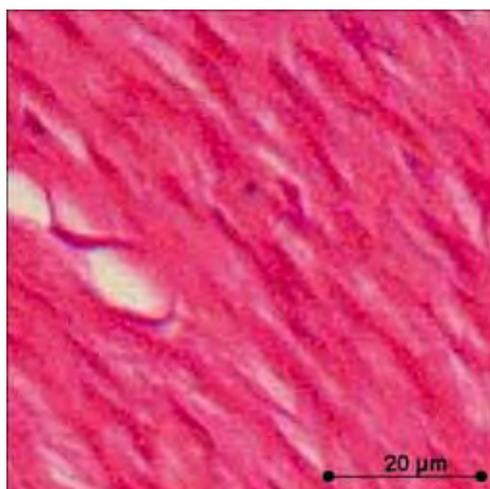
Piroxicam



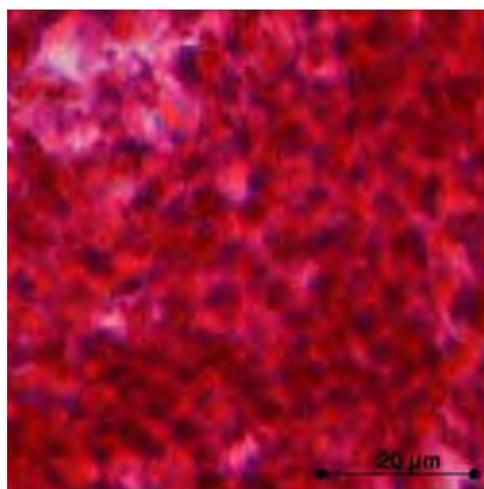
Mangiferina

Celularidade

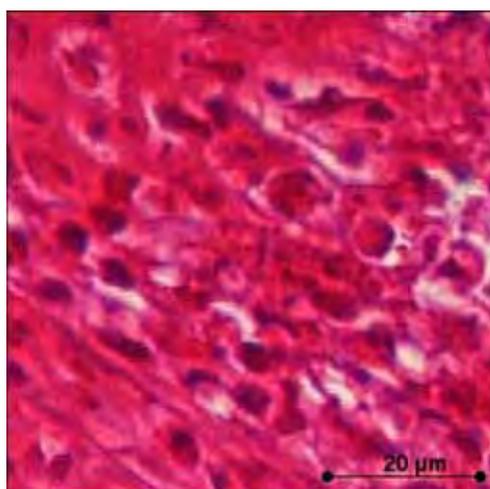
As imagens representam a Celularidade na distal dos primeiros molares inferiores após 1 dia de indução da periodontite em ratos.



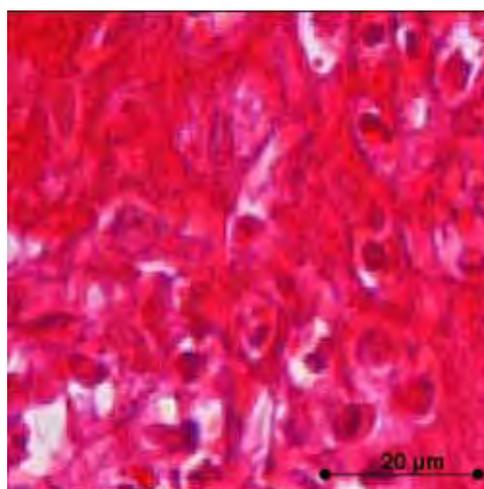
Controle sem-ligadura



Salina

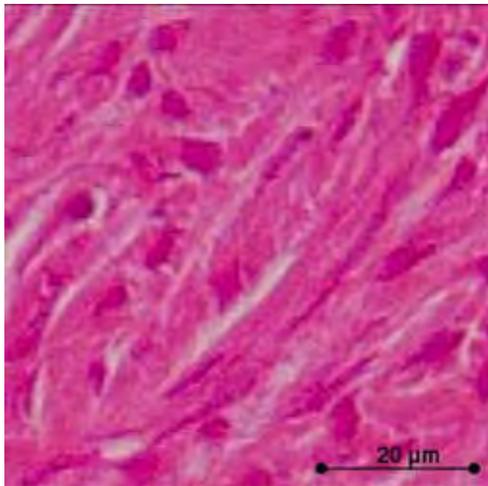


Piroxicam

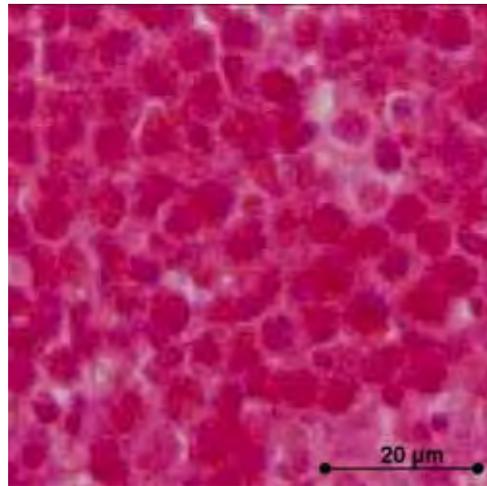


Mangiferina

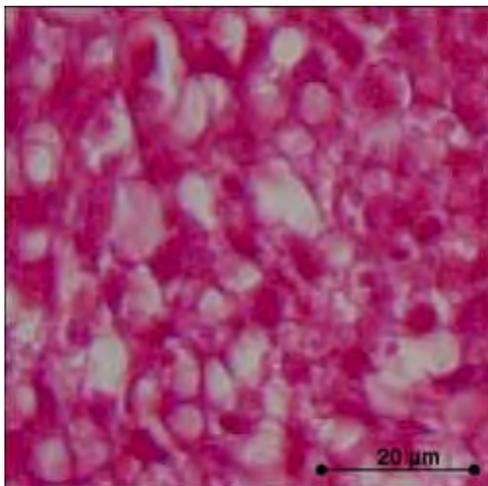
As imagens representam a Celularidade na distal dos primeiros molares inferiores após 4 dias de indução da periodontite em ratos.



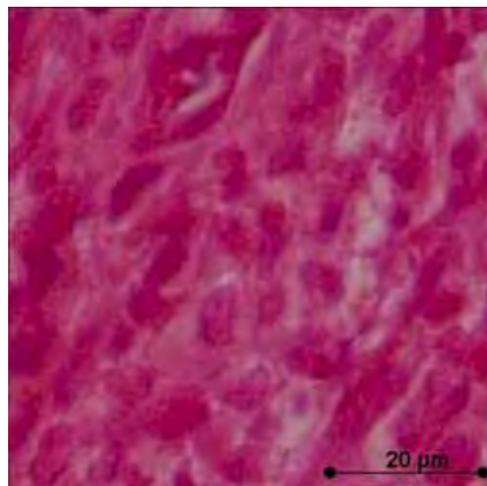
Controle sem-ligadura



Salina

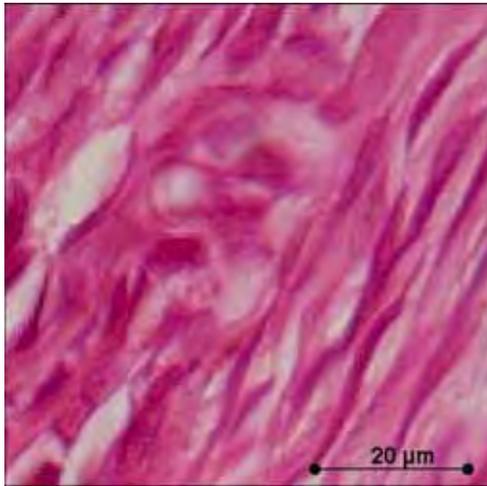


Piroxicam

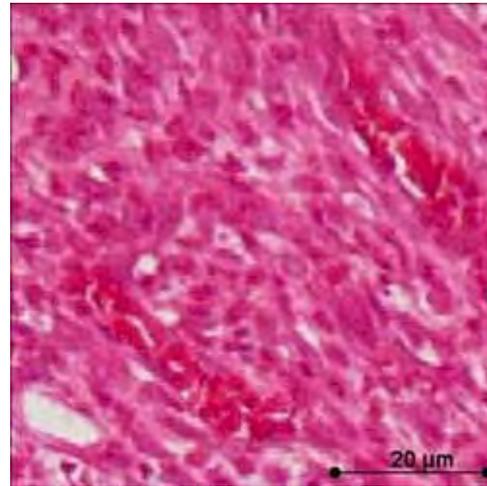


Mangiferina

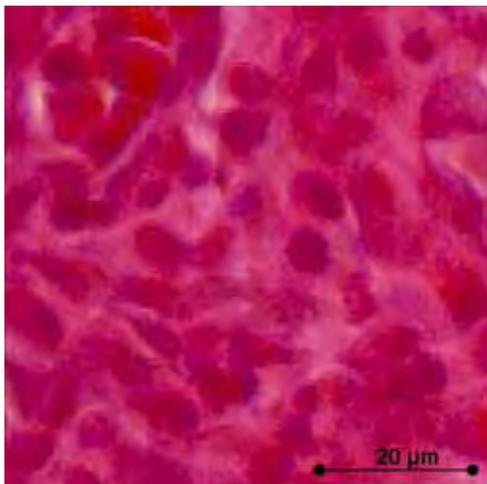
As imagens representam a Celularidade na distal dos primeiros molares inferiores após 7 dias de indução da periodontite em ratos.



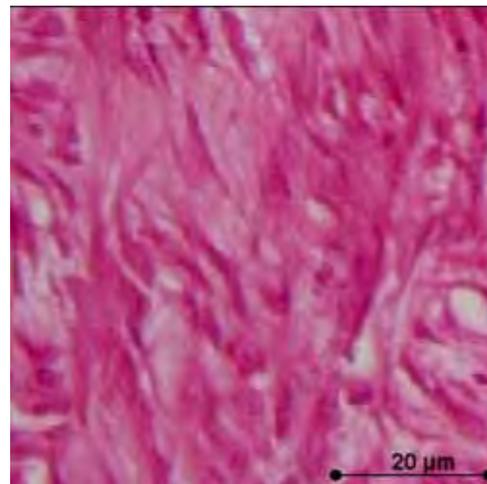
Controle sem-ligadura



Salina



Piroxicam



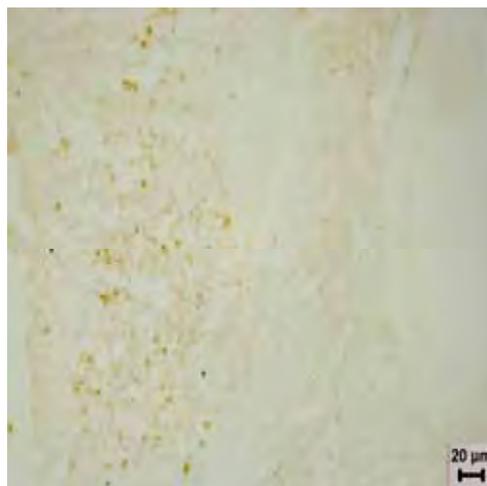
Mangiferina

Expressão de COX-2

As imagens representam a Expressão de COX-2 na distal dos primeiros molares inferiores após 1 dia de indução da periodontite em ratos.



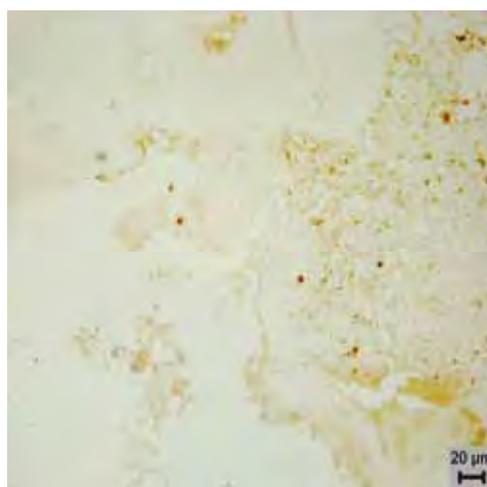
Controle sem-ligadura



Salina

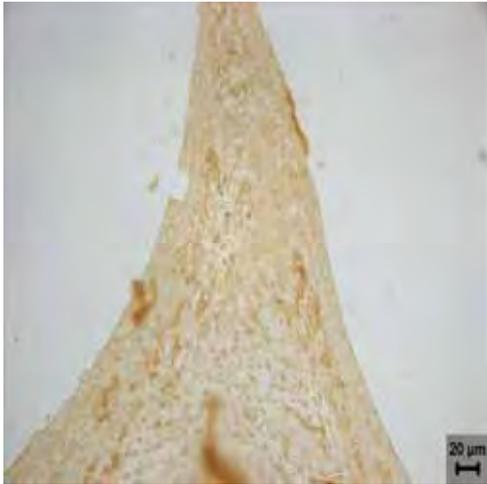


Piroxicam



Mangiferina

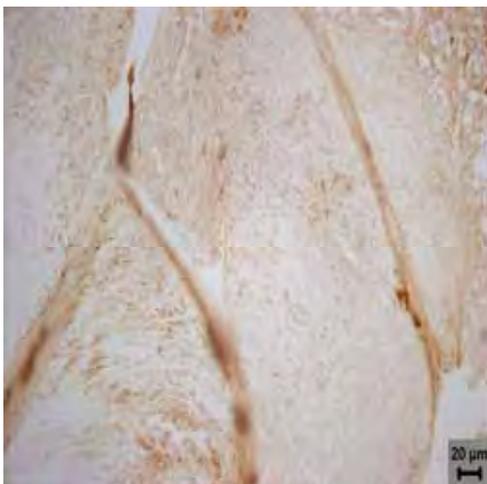
As imagens representam a Expressão de COX-2 na distal dos primeiros molares inferiores após 4 dias de indução da periodontite em ratos.



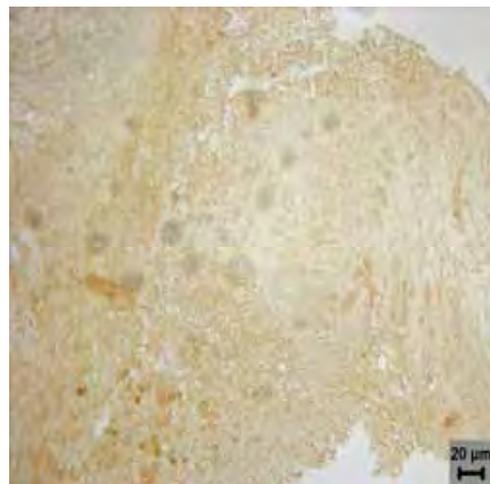
Controle sem-ligadura



Salina

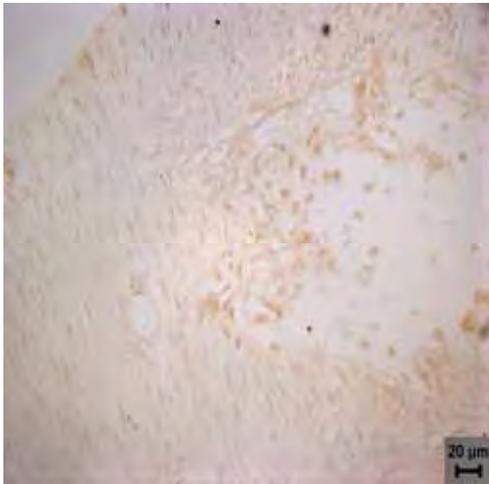


Piroxicam

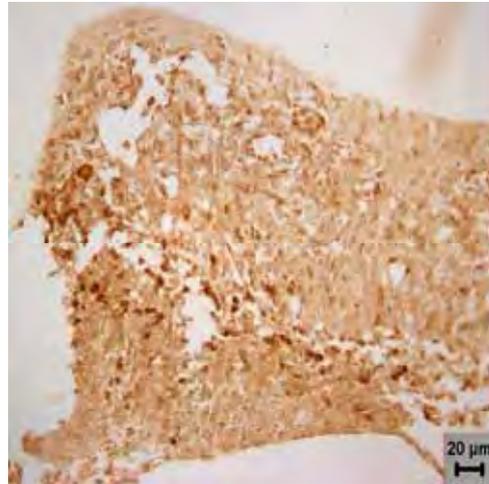


Mangiferina

As imagens representam a expressão de COX-2 na distal dos primeiros molares inferiores após 7 dias de indução da periodontite em ratos.



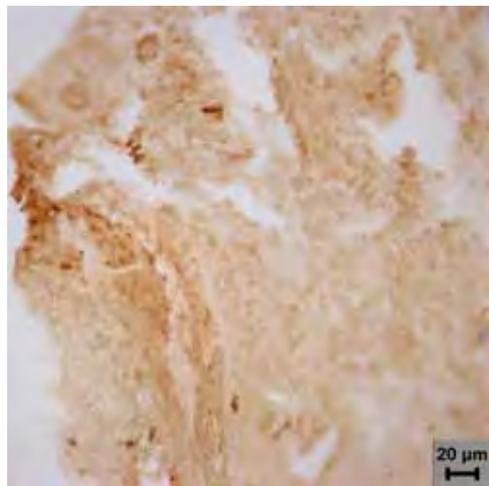
Controle sem-ligadura



Salina



Piroxicam



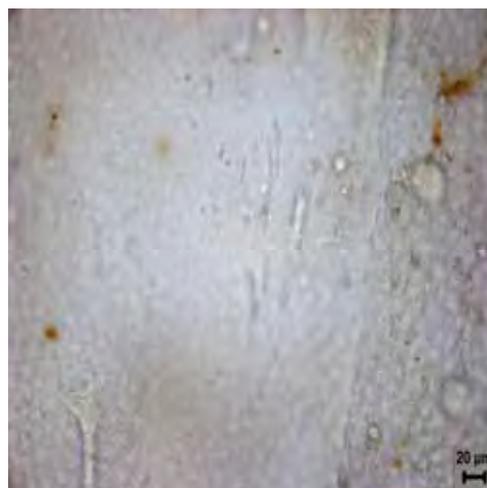
Mangiferina

Angiogênese

As imagens representam a Angiogênese na distal dos primeiros molares inferiores após 1 dia de indução da periodontite em ratos.



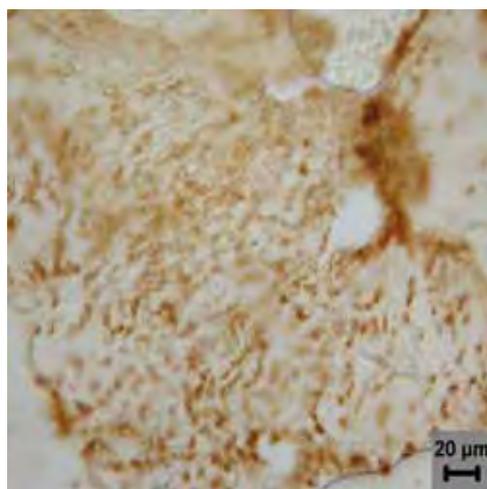
Controle sem-ligadura



Salina



Piroxicam



Mangiferina

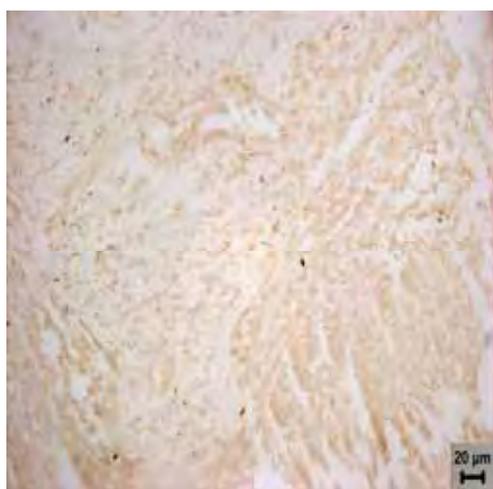
As imagens representam a Angiogênese na distal dos primeiros molares inferiores após 4 dias de indução da periodontite em ratos.



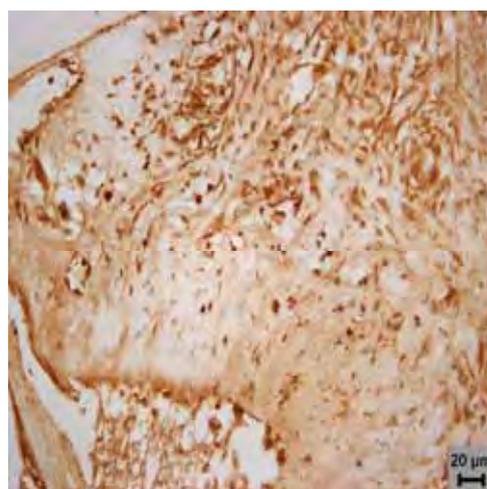
Controle sem-ligadura



Salina

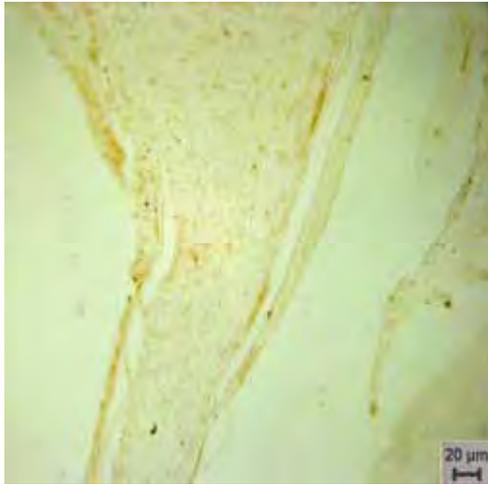


Piroxicam

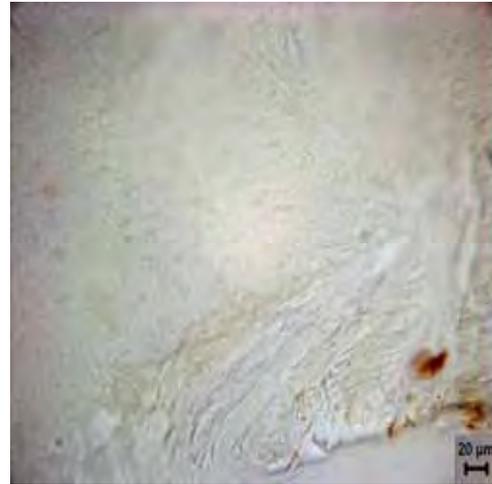


Mangiferina

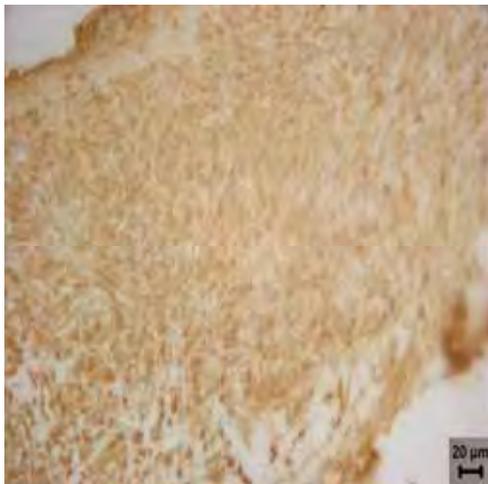
As imagens representam a Angiogênese na distal dos primeiros molares inferiores após 7 dias de indução da periodontite em ratos.



Controle sem-ligadura



Salina



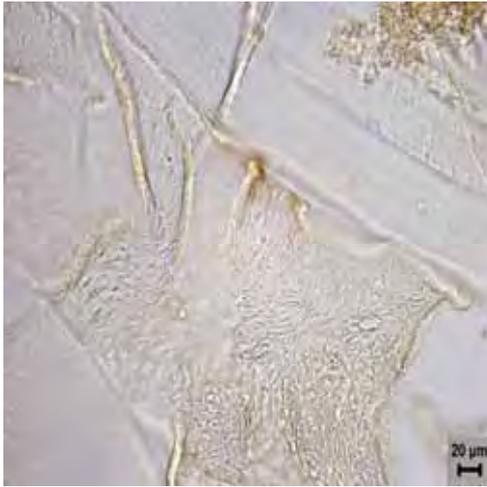
Piroxicam



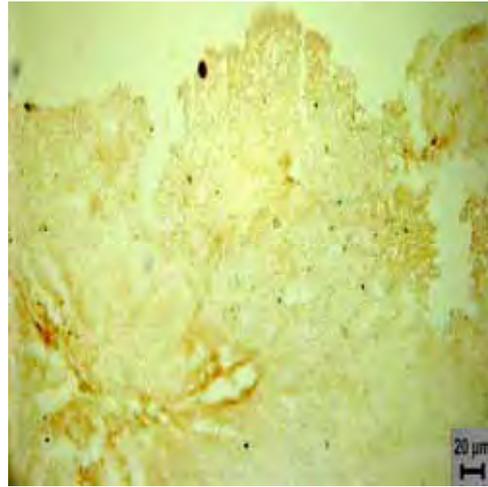
Mangiferina

Proliferação Celular (PCNA)

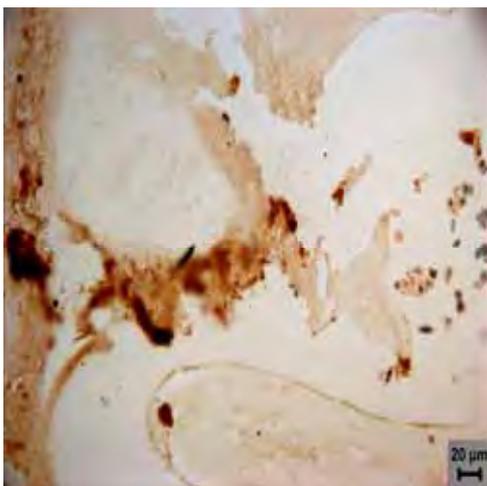
As imagens representam a Proliferação Celular na distal dos primeiros molares inferiores após 1 dia de indução da periodontite em ratos.



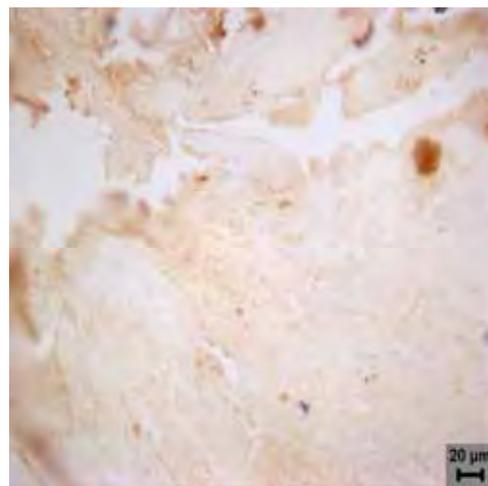
Controle sem-ligadura



Salina

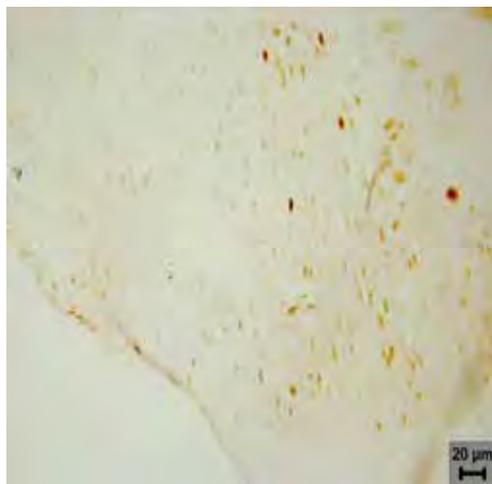


Piroxicam

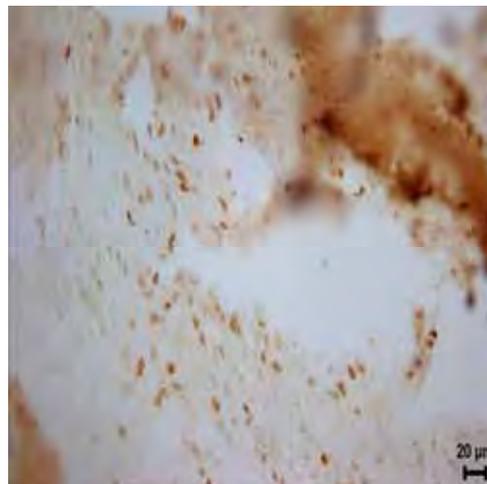


Mangiferina

As imagens representam a Proliferação Celular na distal dos primeiros molares inferiores após 4 dias de indução da periodontite em ratos.



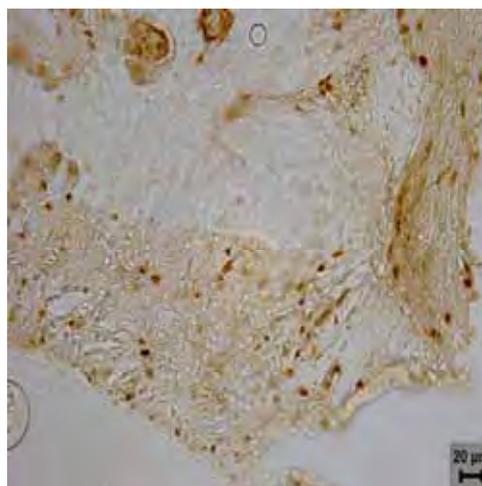
Controle sem-ligadura



Salina

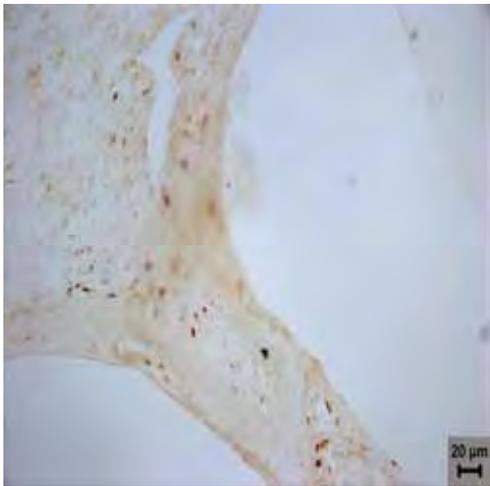


Piroxicam

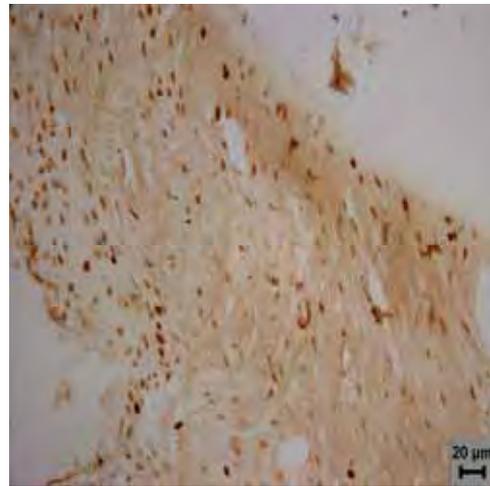


Mangiferina

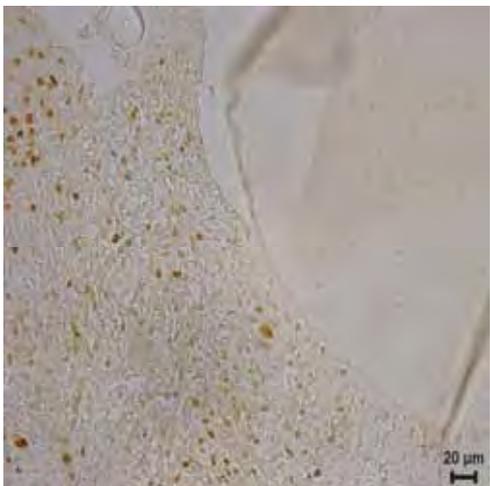
As imagens representam a Proliferação Celular na distal dos primeiros molares inferiores após 7 dias de indução da periodontite em ratos.



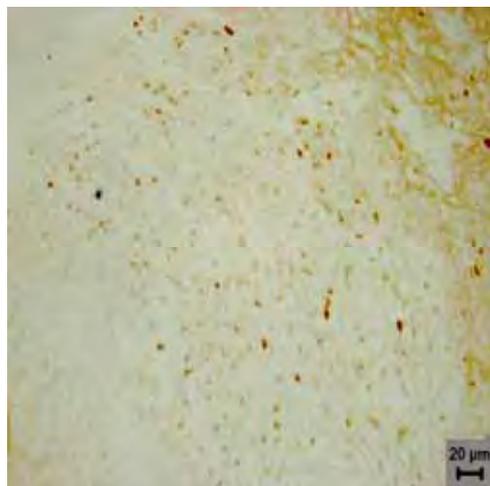
Controle sem-ligadura



Salina



Piroxicam



Mangiferina

Das incertezas deste mundo, uma certeza tenho, e pode-se dizer que é absoluta, “SÓ JESUS SALVA”.