



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Renata Cristina Lima Silva

Efeito da diacereína no tratamento da doença periodontal induzida em molares de ratos

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Renata Cristina Lima Silva

Efeito da diacereína no tratamento da doença periodontal induzida em molares de ratos

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara

2020

Silva, Renata Cristina Lima

Efeito da diacereína no tratamento da doença periodontal
induzida em molares de ratos / Renata Cristina Lima Silva.--

Araraquara: [s.n.], 2020

69 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Doença periodontal 2. Citocinas 3. Metaloproteinases
da matriz 4. Interleucina-1 5. Periodontite I. Título

Renata Cristina Lima Silva

Efeito da diacereína no tratamento da doença periodontal induzida em molares de ratos

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

3º Examinador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Araraquara, 27 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Renata Cristina Lima Silva

NASCIMENTO: 03/10/1994 – Campinas – São Paulo

FILIAÇÃO: Roseli Aparecida de Lima Silva e Vagner João da Silva

2013/2017: Cirurgiã-Dentista graduada pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr-UNESP);

2018/2020: Mestranda em Odontologia (Área de Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr-UNESP).

Dedico esta dissertação a meus familiares, em especial minha mãe, Roseli, e meu pai, Vagner. O apoio e estímulo vindo de vocês foi fundamental para minha persistência e foco no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por cada momento e alegria que temos juntos, e por me mostrar que valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de financiamento 001.

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/11757-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Paulo, por todo ensinamento, suporte e sabedoria a mim confiados durante todo o curso de Mestrado. Obrigada por me passar todo seu admirável conhecimento sobre Histologia, e me ajudar a aplicá-lo à Periodontia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Camila, Evelin, Mateus, Salmo, Fabiane, Flávia e José Paulo. Por todo suporte, paciência, amizade, ajuda com os animais e carinho em me explicar e me ajudar em cada pormenor, mesmo que não fosse incumbência “oficial” de vocês. Especialmente à Fabiane e à Flávia, por me encorajar a aprender a tratar os animais da melhor forma possível; e ao Salmo, pela ajuda com os períodos de medicação.

Aos meus amigos e colegas de Mestrado: Gabriel, Carolina, Mariely, Natalie, Jhonatan, Ingra, Amanda e Marco pela amizade e ajuda em todos os momentos que solicitei. Em especial a Julio e Lorena, pelas fotografias tiradas para este trabalho.

Às minhas amigas mais próximas do curso: Dania, Flávia, Karen e Lorena. Minha gratidão por todos os momentos que tivemos, dos mais divertidos aos mais conturbados. Vocês tornaram tudo mais leve.

Aos Professores Joni e Daniela, pelas considerações durante o Exame Geral de Qualificação. Suas observações foram de grande relevância e contribuíram muito para esta dissertação. Em especial ao Prof. Joni, pela orientação que me deu durante o estágio de Iniciação Científica, do qual guardo ensinamentos até hoje.

À Professora Adriana, por cuidar tão bem das questões relativas à Periodontia, pelos ensinamentos, e por ser amparo e um ombro amigo quando precisamos.

E aos demais amigos, familiares e professores que passaram por mim ao longo dos anos. Todos colaboraram para que chegasse até aqui.

“De uma gota d’água (...) um pensador lógico poderia inferir a possibilidade de um Atlântico ou de um Niágara, sem jamais ter visto um e outro ou ouvido falar deles. Assim, toda vida é uma grande cadeia, cuja natureza se revela ao examinarmos qualquer dos elos que a compõem. Como todas as outras artes, a Ciência da Dedução e Análise só pode ser adquirida por meio de um demorado e paciente estudo, mas a vida não é tão longa que possibilite a um mortal aperfeiçoar-se ao máximo nesse campo. Antes de passar aos aspectos morais e mentais de um assunto que apresenta as maiores dificuldades, o pesquisador deve principiar por tomar conhecimento dos problemas mais elementares. Ao deparar-se com um semelhante, aprenda ele a distinguir imediatamente qual a história do homem e a profissão que exerce. Por mais pueril que esse exercício possa parecer, aguça as faculdades de observação e ensina aonde se deve olhar e o que procurar. Pelas unhas de um homem, pela manga do seu paletó, pelos seus sapatos, pelas joelheiras nas calças, as calosidades do seu indicador e polegar, pela sua expressão, pelos punhos da camisa... em cada uma dessas coisas a profissão de um homem é claramente sugerida. Não se pode aceitar que, em qualquer caso, o conjunto dessas observações deixe de elucidar um investigador competente”¹.

Silva RCL. Efeito da diacereína no tratamento da doença periodontal induzida em molares de ratos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A periodontite (DP) é uma doença imunoinflamatória que promove o recrutamento de células específicas que liberam mediadores, dentre eles interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e metaloproteinases da matriz (MMPs). Há evidências de que a diacereína, uma medicação anti-IL-1, reduz a produção de MMPs e TNF- α . O objetivo do presente estudo foi avaliar se a diacereína acelera a regressão da inflamação e reduz a perda óssea na DP induzida. No total, foram utilizados 66 ratos Holtzman distribuídos, aleatoriamente, nos diferentes grupos. Em 42 ratos, a DP foi induzida com inserção de uma ligadura no 1º molar superior direito por 7 dias. Após a indução, 12 animais foram sacrificados: 6 animais do grupo GP (grupo periodontite) e 6 animais do grupo controle (GC), usado como parâmetro da DP induzida. No 7º dia de indução da DP, a ligadura colocada em 36 ratos foi removida e iniciou-se o tratamento com 100 mg/kg de massa corpórea de diacereína (GPD) ou solução fisiológica (GPS) por gavagem durante 7, 15 e 30 dias. Após 24 horas da administração da última dose, 6 animais de cada grupo (GPD, GPS e GC) foram sacrificados. Após eutanásia, fragmentos de maxila com molares do lado direito foram removidos e logo imersos em solução de formaldeído 4%. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA 7% e processados para inclusão em parafina. De cada fragmento, 5 cortes sagitais semi-seriados foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análises morfológica e quantitativa dos seguintes parâmetros: densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e fibroblastos (VvFb) na mucosa gengival interdentária molares e mensuração das distâncias do epitélio juncional à junção cimento-esmalte (EJ-JCE) e da JCE à crista do processo alveolar (JCE-PA). A reação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), usada como marcador de osteoclastos, foi realizada e o número de osteoclastos TRAP-positivos na superfície do processo alveolar computado. A densidade numérica de células IL-1 β - e MMP-8-positivas, após reações de imuno-histoquímica, também foi avaliada. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$); quando GP e GC foram comparados, utilizou-se o teste *t de Student* não paramétrico. Os resultados revelaram um aumento significativo nas distâncias de EJ-JCE e JCE-PA em GP, GPD e GPS comparados a GC, no qual o término do EJ coincidiu com a JCE em todos os períodos. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre GPD e GPS de todos os períodos. Em todos os períodos, foi verificada uma redução significativa na VvCI dos animais tratados com diacereína comparados ao GPS. Não foi detectada diferença no número de osteoclastos entre GPD e GC. Aos 7 e 15 dias, o número de osteoclastos foi significativamente menor no GPD do que no GPS, enquanto aos 30 dias, diferenças não foram detectadas. A imunoexpressão de IL-1 β nos espécimes do GPD foi significativamente menor em comparação ao GPS, nos diferentes períodos. Após 15 e 30 dias, não foram detectadas diferenças entre os grupos GPD e GC. Uma acentuada imunoexpressão de MMP-8 foi detectada na mucosa com DP, exceto aos 30 dias. Neste período, não foi detectada diferença entre GPD e CG. O número de células MMP-8-imunopositivas foi significativamente menor no GPD em comparação ao GPS de todos os períodos. Nossos resultados apontam para uma ação inibitória da diacereína sobre a IL-1 β na mucosa gengival com periodontite, promovendo redução no infiltrado inflamatório, no número de osteoclastos e na imunoexpressão de MMP-8, exercendo papel benéfico na regressão da doença periodontal.

Palavras – chave: Doença periodontal. Citocinas. Metaloproteinases da matriz. Interleucina-1. Periodontite.

Silva RCL. Effect of diacerein in the treatment of induced periodontal disease in rat molars [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Periodontitis (PD) is an immunoinflammatory disease that promotes the recruitment of specific cells. These cells release mediators, including interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and matrix metalloproteinases (MMPs). There is evidence that diacerein, an anti-IL-1 drug, reduces the production of MMPs and TNF- α . The aim of the present study was to evaluate if diacerein accelerates the regression of inflammation and reduces bone loss in induced PD. Sixty-six Holtzman male rats were randomly distributed in different groups. Periodontal disease was induced for 7 days in the upper right first molar of 42 rats. After 7 days of PD induction, 12 animals were killed: 6 animals from the control group (CG) and 6 animals from the PG group (periodontitis group). Thirty-six rats with PD received 100 mg/kg of diacerein body mass (PDG) per gavage or saline solution (PSG) for 7, 15 and 30 days. In each period, 6 animals of PDG, PSG and 6 animals without any treatment (healthy periodontium) were killed (CG). After euthanasia, fragments of maxilla containing the molars were removed and immediately immersed in a 4% formaldehyde solution. After decalcification in 7% EDTA, the fragments were processed for paraffin-embedding. From each specimen, non-serial sagittal sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphological and quantitative analyses of the following parameters: volume density of inflammatory cells (VvIC) and fibroblasts (VvFb) in the lamina propria of the interdental gingiva, between the 1st and 2nd molars; the distances between the junctional epithelium to the cemento-enamel junction (JE-CEJ) and the CEJ to the alveolar process crest (CEJ-AP) were measured. The histochemical reaction for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), used as an osteoclast marker, was performed and the number of TRAP-positive osteoclasts on the alveolar process surface was computed. Moreover, the numerical density of IL-1 β - and MMP-8-immunopositive cells was obtained. Quantitative data were subjected to two-way analysis of variance (two-way ANOVA) and Tukey's post-test ($p \leq 0.05$); when PG and CG were compared, the non-parametric t Student test was used. The results revealed a significant increase in the distances of JE-CEJ and CEJ-AP in the animals of PG, PDG and PSG groups compared with the CG; in the CG, the most apical portion of JE was situated at the JCE, at all periods. Significant differences in the CEJ-PA and JE-CEJ measurements were not detected between the PDG and PSG groups, at all time points. Significant reduction in VvIC was observed in diacerein-treated animals compared to the GPS group, at all periods. At all periods, no significant difference was detected in the number of osteoclasts between the PDG and CG groups. At 7 and 15 days, the number of osteoclasts was significantly lower in the PDG than in PSG, while significant difference was not detected at 30 days. The immunoexpression of IL-1 β in PDG specimens was significantly lower than in PSG, at all time points. After 15 and 30 days, no significant differences were detected between animals of PDG and CG groups. An enhanced immunoexpression of MMP-8 was seen in the gingival mucosa of animals with periodontal disease, except at 30 days. In this period, no significant difference was detected between animals of PDG and CG groups. The number of MMP-8-immunopositive cells was significantly reduced in PDG specimens in comparison with PSG, at all periods. Our results point to an inhibitory action of diacerein on IL-1 β in the gingival mucosa of rat molars with periodontitis, promoting a reduction in the inflammatory infiltrate, in the number of osteoclasts and in the immunoexpression of MMP-8, thus playing a beneficial role in the regression of periodontal disease.

Keywords: Periodontal disease. Cytokines. Matrix metalloproteinases. Interleukin-1. Periodontitis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: porcentagem

< : menor

=: igual

> : maior

$\leq$: menor ou igual

$\geq$: maior ou igual

°C: graus Celsius

°GL: graus Gay-Lussac

μ L: microlitro

μ m: micrômetro

ADAMTS: desintegrina e metaloproteinase com trombospodina

BSA: albumina sérica bovina

bw: *body weight*

COX: ciclooxigenase

CXCL8: gene para expressão de IL-8

DAB:3,3-diaminobenzidina

DP: doença periodontal

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EJ: epitélio juncional

Fb: fibroblasto

FI: fibras interdentárias

Fig.: figura

GC: grupo controle, sem tratamento

GP: grupo com periodontite induzida, sem tratamento

GPD: grupo com periodontite induzida, tratado com diacereína

GPS: grupo com periodontite induzida, tratado com solução fisiológica

HE/H&E: hematoxilina e eosina

I-CAM1: molécula de adesão intercelular-1

ICE: enzima conversora de IL-1

Ig: imunoglobulina

IgG: imunoglobulina G

IL-1: interleucina-1

IL-17: interleucina-17
IL-1R: receptor de IL-1
IL-1Ra: antagonista de receptor de IL-1
IL-1 α : interleucina-1 alfa
IL-1 β : interleucina-1 beta
IL-6: interleucina-6
IL-8: interleucina-8
iNOS: óxido nítrico sintase
JCE: junção cemento-esmalte
kDa: kiloDalton
LP: ligamento periodontal
LPS: lipopolissacarídeo
M: molar ou mol/litro
MEC: matriz extracelular
mg: miligrama
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: miliMolar
mm²: milímetro quadrado
MMP (-1 a -28): metaloproteinases da matriz (variam de 1 a 28)
NF- κ B: fator nuclear kappa B
OPG: osteoprotegerina
p: nível de significância
PA: processo alveolar
PBS: solução salina com tampão fosfato
PGE₂: prostaglandina E₂
pH: potencial hidrogeniônico
RANK: receptor ativador do fator nuclear kB
RANK-L: ligante de RANK
TIMP: inibidores de metaloproteinases da matriz
TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa
TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
VCAM-1: proteína de adesão celular vascular-1
Vv: densidade de volume

VvCI: densidade de volume de células inflamatórias

VvFb: densidade de volume de fibroblastos

VvO: densidade de volume de outros componentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Doença Periodontal	19
3.1.1 Interleucina-1	19
3.1.2 Fator de necrose tumoral-alfa.....	20
3.1.3 Metaloproteinases da matriz	21
3.1.4 Reabsorção óssea decorrente da periodontite	22
3.2 Diacereína.....	23
3.3 Diacereína e Doença Periodontal.....	24
4 MATERIAL E MÉTODO	25
4.1 Procedimentos Experimentais.....	25
4.2 Processamento Laboratorial para Inclusão em Parafina	27
4.3 Formas de Análise	28
4.3.1 Análise morfológica	28
4.3.2 Análise morfométrica dos cortes corados com HE	29
4.3.2.1 Mensuração do nível de inserção do epitélio juncional.....	29
4.3.2.2 Mensuração no nível da crista do processo alveolar	29
4.3.2.3 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)	30
4.3.3 Osteoclastos TRAP-positivos na superfície óssea.....	31
4.3.4 Análise imuno-histoquímica para detecção de IL-1 e MMP-8	32
4.4 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Análises Morfológica e Morfométrica.....	34
5.1.1 Mensuração do nível de inserção do epitélio juncional.....	37
5.1.2 Mensuração da distância da junção cimento-esmalte à crista do processo alveolar	38
5.1.3 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)	40
5.2 Número de Osteoclastos TRAP-positivos	43

5.3 Detecção de IL-1β na Mucosa Gengival	49
5.4 Imunopositividade da MMP-8 na Mucosa Gengival	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Certificado de Aprovação pela CEUA.....	70

1 INTRODUÇÃO

As condições patológicas mais comuns que afetam tecidos periodontais desencadeiam processos inflamatórios, que afetam, de modo geral, a gengiva e o aparato de inserção, ocasionando as doenças periodontais. Dentre elas, a periodontite tem etiologia multifatorial e é uma das doenças mais prevalentes em humanos, que leva a reabsorção óssea (ou perda óssea)²⁻⁴. Durante o acúmulo de biofilme subgengival característico da periodontite, inicia-se a resposta do hospedeiro ao agente agressor, de modo a liberar citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-6, TNF- α e IL-17, que colaboram para inflamação aguda e crônica, além de estimular a liberação de mediadores secundários (como metaloproteinases da matriz - MMPs)^{5,6}.

A IL-1 está envolvida em uma diversidade de mecanismos patogênicos da periodontite; sítios com periodontite ativa levam ao aumento nos níveis tanto de IL-1 α quanto de IL-1 β . No entanto, a forma predominante na periodontite é a IL-1 β ⁷. Esta interleucina é produzida por células como monócitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais, células B e osteócitos^{8,9}. Além disso, a IL-1 β estimula a secreção da quimiocina IL-8, ocasionando o recrutamento de neutrófilos ao sítio¹⁰. A IL-1B induz a reabsorção óssea via prostaglandina E₂ (PGE₂), e desempenha um papel importante na resposta imunológica adaptativa, controlando células apresentadoras de antígeno, e estimulando macrófagos a secretarem IL-6 e, por consequência, ativar linfócitos B^{9,11}. A IL-1 β induz à formação de osteoclastos, estimula a secreção de MMPs, desencadeando reabsorção óssea alveolar e degradação da matriz extracelular do tecido conjuntivo¹².

As MMPs fazem parte de uma família de endopeptidases que contém 28 membros (desde MMP-1 até MMP-28), sendo responsáveis pela remodelação tecidual e pelo processo de degradação do tecido conjuntivo¹³. Uma destas enzimas, a MMP-8, também denominada collagenase-2, é responsável pela degradação de colágenos dos tipos I, II e III¹⁴. Na terapia periodontal básica (raspagem e alisamento radicular), é encontrada uma diminuição nos níveis de MMP-8 no fluido crevicular, ao passo que bolsas periodontais com risco de destruição tecidual irreversível apresentam níveis elevados desta MMP¹⁵. Além disso, foi demonstrado que níveis de mieloperoxidase, oriunda de neutrófilos (encontrada nos grânulos primários deste polimorfonuclear), no fluído crevicular estão relacionados à ativação da MMP-8, estando então relacionados à severidade da periodontite¹⁶. Desta maneira, a MMP-8 é uma collagenase relevante na patogênese da doença periodontal.

A diacereína¹⁷, é um medicamento com efeitos anti-inflamatórios e analgésicos^{5,18,19}. Atualmente, é utilizada como abordagem terapêutica em casos como osteoartrite^{5,20,21}, com ação sobre a sintomatologia dolorosa e sobre a estrutura da articulação²². Estudos in vitro e in vivo têm reportado que este fármaco exerce um papel como inibidor de IL-1^{19,22,23}, além de possuir efeito inibitório em eventos subsequentes à ação da citocina mencionada, como sobre MMPs e NF-kB⁵. Assim, devido a sua ação anti-inflamatória e anti-reabsortiva, é possível que a diacereína possa amenizar os efeitos deletérios promovidos pela doença periodontal.

2 PROPOSIÇÃO

No presente estudo, o objetivo foi investigar se a diacereína acelera a regressão do processo inflamatório e inibe a perda óssea, exercendo efeito benéfico no tratamento de molares de ratos com doença periodontal induzida. Assim, os objetivos específicos foram investigar se a diacereína:

- ✓ exerce interferência na regressão do processo inflamatório na mucosa gengival;
- ✓ inibe a reabsorção do processo alveolar;
- ✓ exerce influência sobre a imunoexpressão de IL-1 na mucosa gengival;
- ✓ interfere com a imunoexpressão de MMP-8, enzima responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular na doença periodontal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença Periodontal

A periodontite é uma condição inflamatória caracterizada pela destruição de estruturas de suporte dos dentes, representa um fator modificador da saúde sistêmica, sendo iniciada e mantida pelo complexo microbiano derivado do biofilme. Embora seja desencadeada por acúmulo de bactérias anaeróbias Gram-negativas subgengivais, tem sido demonstrado que a resposta imunoinflamatória contra patógenos resulta em destruição de tecidos moles e mineralizados do periodonto de sustentação^{24,25}. O organismo do hospedeiro inicia então uma resposta local, recrutando células inflamatórias, liberando enzimas líticas e mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias [interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)] e mediadores secundários [metaloproteinases da matriz (MMPs) e prostaglandina E₂ (PGE₂)]. Em adição ao tratamento periodontal tradicional, a regulação da interação imunoinflamatória pode ser uma abordagem potencial para prevenir e tratar doenças periodontais⁵.

A periodontite é considerada a doença óssea lítica mais prevalente em humanos⁴, e tem etiologia multifatorial; fatores de risco genéticos e ambientais agravam ou auxiliam no desencadear da patologia, como idade, microbiota específica do biofilme, tabagismo, diabetes mellitus, obesidade, além de fatores psicossociais^{2,3}. Existe então o consenso de que a periodontite pode estar associada a condições sistêmicas e que algumas formas da doença podem ser refratárias ao tratamento convencional²⁶.

3.1.1 Interleucina-1

A subfamília Interleucina-1 (IL-1) engloba: IL-1 α , IL-1 β , antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra)^{12,27}. IL-1 α e IL-1 β ligam-se ao receptor de IL-1 (IL-1R), sendo potentes interleucinas pró-inflamatórias; ambas são processadas em formas ativas menores e então secretadas via retículo endoplasmático/complexo de Golgi-independente, porém os mecanismos de secreção proteica não são convencionais e ainda pouco se sabe a respeito²⁸. Esta citocina pró-inflamatória é uma das responsáveis pela indução de destruição óssea características de uma série de doenças, como artrite reumatoide, doença periodontal e osteoartrite²⁹.

A IL-1 β é produzida após a pro-IL-1 β ser processada pela caspase-1, em terminal-N 14-kDa (inativo) e terminal-C 17-kDa (forma madura e ativa)²⁸, e ativada pelo complexo multiproteico intracelular (inflamassoma)¹². A citocina tem papel na inflamação e imunidade, essencialmente imunidade inata. A IL-1 β induz síntese e secreção de mediadores que contribuem para alterações inflamatórias e dano tecidual, como PGE₂, fator de ativação das plaquetas e óxido nítrico, resultando em maior fluxo sanguíneo para o local de infecção ou lesão tecidual. Esta citocina é produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, além de fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais, células B e osteócitos^{8,9}. A IL-1 β aumenta a expressão do ICAM-1 nas células endoteliais e estimula secreção da quimiocina CXCL8 (IL-8), recrutando neutrófilos aos tecidos afetados. A IL-1 β tem sinergia com outras citocinas e PGE₂ para induzir reabsorção óssea. Além disso, tem seu papel na resposta imune adaptativa, desde que controla as células apresentadoras de antígeno (como células dendríticas), estimula a secreção de IL-6 por macrófagos (ativando células B), e foi demonstrado que a sinalização deste mediador induz respostas mais duradouras e robustas de células CD4^{9,11}. Esta interleucina também induz a formação de osteoclastos, expressão de MMPs, culminando na reabsorção do osso alveolar e degradação do tecido conjuntivo¹². Concentrações de IL-1 β no fluido crevicular são maiores em sítios com gengivite³⁰ e periodontite³¹.

Foi demonstrado, em culturas de osteoblastos e células do baço de camundongos, que a IL-1 induz indiretamente à osteoclastogênese via síntese de PGE₂³². No entanto, seu papel é direto na multinucleação dos osteoclastos³³.

A indução de mediadores primários, como IL-1, estimula a produção de mediadores secundários (como MMPs, cicloxigenase - COX e PGE), os quais amplificam a resposta inflamatória, promovendo infiltração de células inflamatórias, indução de enzimas que degradam tecido conjuntivo e reabsorção óssea alveolar⁵. Consequentemente, o uso de terapia com mediador anti-inflamatório, junto a tratamentos anti-biofilme, pode neutralizar e atenuar a progressão da doença. Portanto, a estratégia envolve antagonizar efeitos destrutivos de citocinas específicas, propagação da inflamação, perda de tecido conjuntivo, ativação de osteoclastos e perda de osso alveolar⁵.

3.1.2 Fator de necrose tumoral-alfa

O TNF- α é um mediador fundamental na doença periodontal e compartilha muitas das ações celulares da IL-1 β ³⁴. Este fator aumenta a atividade neutrofílica, promovendo a

degradação tecidual, aumentando secreção de MMPs, além de estimular osteoclastogênese e induzir apoptose de fibroblastos. O TNF- α é secretado por macrófagos ativados e outros tipos celulares, particularmente em resposta ao LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano. Seus efeitos incluem estimulação de células endoteliais para expressar selectina, que facilita recrutamento de leucócitos, ativação da produção de IL-1 β pelo macrófago e indução da PGE₂ pelos macrófagos e fibroblastos gengivais³⁵.

IL-1 β e TNF- α regulam expressão de RANKL e OPG (osteoprotegerina), participando do processo de remodelação óssea^{12,36}. São consideradas citocinas osteotrópicas, pois estimulam a diferenciação de osteoclastos e, por conseguinte, a reabsorção óssea³⁷. Apesar da similaridade de atividade com a IL-1 β , o TNF- α tem um efeito menos potente sobre os osteoclastos e está presente em níveis mais baixos que a IL-1 β nos tecidos gengivais inflamados³⁸. Desta forma, a importância do TNF- α na patogênese da doença periodontal é evidente. Antagonistas de IL-1 β e TNF- α causam redução de 80% no recrutamento de células inflamatórias nas proximidades do osso alveolar e 60% na perda óssea³⁹. Além disso, foi evidenciada correlação positiva entre severidade da periodontite e concentração da IL-1 β no fluído gengival⁴⁰.

3.1.3 Metaloproteinases da matriz

O ligamento periodontal é um dos tecidos de maior atividade metabólica, sendo que maior parte desta atividade está na remodelação de componentes da matriz extracelular (MEC). A razão para isso está na capacidade de adaptação às forças oclusais durante a função. A remodelação dos componentes da MEC envolve diversas enzimas, incluindo as MMPs^{25,41}.

As MMPs são uma família de enzimas dependentes do zinco capazes de degradar moléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno^{42,43}. As MMPs desempenham função na degradação de componentes, particularmente proteínas da MEC, e são secretadas pela maioria dos tipos de células do periodonto: fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, osteoclastos, neutrófilos e macrófagos^{41,44}.

A transcrição de genes que codificam as MMPs é suprarregulada por citocinas, como IL-1 β e TNF- α ⁴⁴. TIMPs (inibidores de metaloproteinases da matriz) produzidos por macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais) são inibidores específicos que se ligam às MMPs em proporção 1:1⁴⁵. Nos tecidos periodontais saudáveis, existe um processo controlado de homeostase do colágeno, mediado extracelularmente pela MMP-1 (expressa por

células residentes, em maior parte fibroblastos) e intracelularmente por enzimas lisossômicas. Nos tecidos periodontais inflamados, há quantidades excessivas de MMPs secretadas por células residentes e células do infiltrado inflamatório (particularmente, neutrófilos). O rompimento no equilíbrio entre MMPs e seus inibidores resulta na degradação da matriz de tecido^{42,46}.

Na periodontite, as enzimas secretadas por neutrófilos são predominantemente MMP-8 e -9⁴⁷, envolvidas na degradação do colágeno tipo I, o mais abundante do ligamento periodontal⁴⁸. Foi demonstrado que níveis destas enzimas aumentam com o agravamento da doença periodontal e diminuem após tratamento^{47,49}. Os sinais clínicos da doença tendem a aparecer com a liberação excessiva e prolongada destas enzimas, destruindo componentes estruturais do tecido conjuntivo²⁷.

Desta forma, MMPs exercem fundamental papel na homeostase do tecido conjuntivo e na patogênese das doenças periodontais, além de possuírem ampla gama de efeitos de importância na periodontite. Estas enzimas são relevantes no processo de destruição do osso alveolar, sendo expressas por osteoclastos^{27,41} e são fundamentais para acesso do osteoclasto ao sítio de reabsorção, particularmente MMP-9⁵⁰ e MMP-14⁵¹. A MMP-14 está na borda em escova dos osteoclastos, enquanto osteoblastos e osteócitos expressam MMP-13, a qual atua nas superfícies previamente reabsorvidas removendo restos de colágeno⁵².

3.1.4 Reabsorção óssea decorrente da periodontite

A reabsorção do processo alveolar ocorre simultaneamente à degradação do ligamento periodontal na periodontite³⁴. Osteoclastos são células gigantes multinucleadas, ativadas por uma série de mediadores, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂⁵³.

Avanços na biologia óssea têm demonstrado que a reabsorção óssea é regulada pela interação de um sistema de citocinas pertencentes às superfamílias de ligante e receptor do fator de necrose tumoral, que compreende o sistema de osteoclastogênese RANK/RANKL/OPG⁵⁴⁻⁵⁶. Além disso, células imunológicas expressam as três moléculas mencionadas, e acredita-se que o eixo RANK/RANKL/OPG está associado à regulação de respostas inflamatórias e imunes⁵⁷. RANK é um receptor de superfície celular expresso por células progenitoras de osteoclasto e osteoclastos maduros⁵⁴. O RANKL, ligante do RANK, é expresso por células estromais da medula óssea, osteoblastos, osteócitos e fibroblastos, além de células B e T estimuladas por citocinas e LPS bacteriano^{54,56}. A ligação RANK-RANKL resulta em

diferenciação e ativação de osteoclastos e, conseqüentemente, reabsorção óssea. A OPG (osteoprotegerina) é produzida por células estromais da medula óssea, osteoblastos e fibroblastos⁵⁴, sendo solúvel e circulante; esta glicoproteína atua como “receptor decoy” do RANKL, portanto, interferindo na interação RANK-RANKL^{55,56}.

Na reabsorção óssea fisiológica, o equilíbrio entre atividades de osteoblastos e osteoclastos é essencial para que a integridade óssea seja mantida^{55,58}. Enquanto RANKL promove ativação e diferenciação de osteoclastos, a OPG inibe diferenciação dos osteoclastos^{24,54}. Em condições patológicas, tal equilíbrio é prejudicado, levando a predomínio do processo de reabsorção sobre o de formação óssea^{24,58}. A formação excessiva de osteoclastos é observada em doenças inflamatórias crônicas, como periodontite^{24,25,37}, na qual proporções de RANKL:OPG no fluído crevicular⁵⁹ e mucosa gengival²⁴ são mais altas em comparação ao periodonto saudável. Desta maneira, é claro o envolvimento destes componentes na patogênese periodontal^{24,36}.

3.2 Diacereína

A diacereína, comercializada como “Artrodar[®]”¹⁷, é um derivado purificado de antraquinona descoberto em plantas com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas^{5,18,19}. Esta droga é metabolizada no fígado e filtrada nos rins⁶⁰ e sua ação tem sido observada, principalmente, em processos inflamatórios em articulações. Por esta razão, é aplicada no tratamento de osteoartrite, atuando com moderado efeito anti-inflamatório e antipirético, além de efeitos antiartríticos^{5,20,21}. Sugere-se que seu efeito seja tanto sobre a sintomatologia dolorosa da artrite quanto sobre a estrutura articular²².

O fármaco é metabolizado, nos animais e humanos^{23,61}, em reína (ácido 4,5-di-hidroxi-9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-2-carboxílico) por acetilação no fígado. Há evidências, in vivo e in vitro, de que este componente reduz a degeneração da cartilagem, inibindo síntese de IL-1 β e, conseqüentemente, reduzindo ativação de MMPs^{62,63}. Além disso, foi demonstrado in vivo que regula produção de MMPs (retroalimentação negativa), e a produção de inibidores de MMP-1 (retroalimentação positiva) em condrócitos articulares⁶⁴. Seu mecanismo de ação não foi completamente identificado, mas sabe-se que não inibe síntese de COX (e de prostaglandinas, por consequência), como anti-inflamatórios não esteroidais²³. Estudos têm demonstrado que a diacereína possui potencial efeito anti-inflamatório por inibir síntese e atividade de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 em monócitos humanos^{20,21}.

A diacereína reprime a síntese de IL-1 e seus eventos subsequentes, incluindo das enzimas induzíveis iNOS, estromelinisina-1, colagenase, MMPs-1, -3, -9 e -13 e suas atividades, um domínio de desintegrina e metaloproteinase com padrões de trombospondina (ADAMTS), através da inibição de cascatas intracelulares de NF-kB ou MAP quinases. Além disso, a diacereína afeta a ativação da IL-1, devido à inibição da enzima conversora de IL-1 (ICE)⁵. Foi demonstrado *in vitro* que a diacereína tem como principal mecanismo de ação a inibição da IL-1 β , mostrando impacto sobre essa citocina por reduzir a concentração da ICE, assim como aumentou a sensibilidade a IL-1 por diminuir níveis de receptores na superfície celular de condrócitos e, indiretamente, aumentar a produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra)¹⁹.

Os efeitos farmacológicos da diacereína também interferem na quimiotaxia e fagocitose de células imunes, supressão da diferenciação de osteoclastos pelo bloqueio de IL-1 β , e redução da síntese de fatores de reabsorção em termos de modulação da proporção RANKL/OPG. Além disso, a diacereína reduz a produção de IL-6 em osteoblastos subcondrais de osso humano, contribuindo para modular remodelação óssea em articulações⁵.

O efeito anti-inflamatório da diacereína pode ser devido, parcialmente, à inibição da produção de espécies de oxigênio reativo, baseando-se em inibição da ativação de neutrófilos. Além disso, inibe a produção de IL-1 (*in vivo* e *in vitro*). Em suma, é provável que a droga module a resposta inflamatória interferindo com diversas vias de sinalização^{22,23,61}.

3.3 Diacereína e Doença Periodontal

Até o momento, não há relatos descrevendo efeitos terapêuticos da diacereína para doenças periodontais, porém é possível que a medicação possa modular este processo, considerando a sua interferência, particularmente, sobre a IL-1 e MMPs, mediadores que desempenham importante papel na complexa série de eventos moleculares envolvidos na instalação da doença periodontal. Recentemente, fatores do hospedeiro ligados à destruição do tecido periodontal têm sido investigados como promissores alvos da terapêutica para inibir a progressão da doença⁵. Portanto, é provável que a diacereína possa ter um importante papel terapêutico no tratamento da doença periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODO

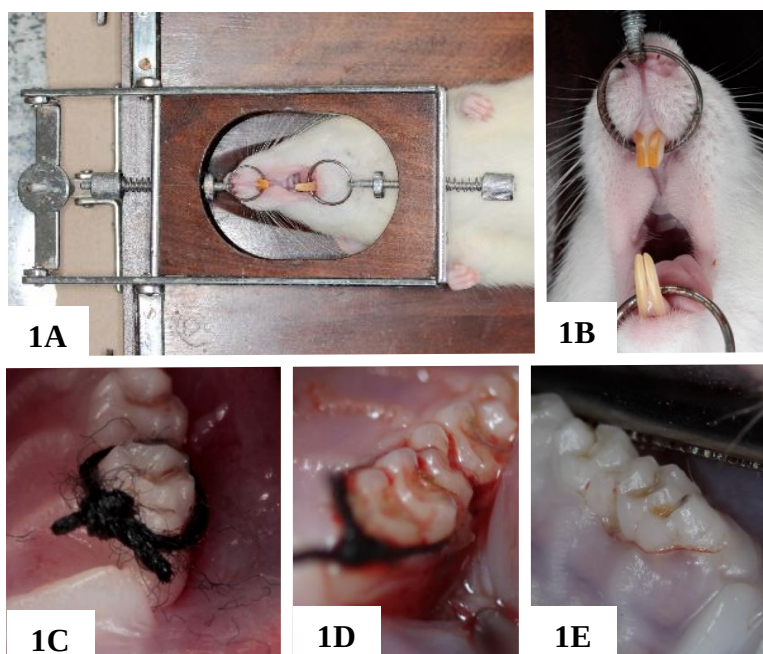
4.1 Procedimentos Experimentais

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, Processo número 17/2018 – Anexo A). Foram utilizados 66 ratos (*Ratus norvegicus albinus*, Holtzman), adultos, com peso aproximado de 250 gramas, oriundos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas, com fotoperíodo das 7h00 às 19h00 (12h claro, 12h escuro) e sob regime hídrico e alimentar *ad libitum*. Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos.

A doença periodontal (DP) foi induzida com inserção de uma ligadura (fio de algodão n°40) no colo cervical do primeiro molar superior direito. Os ratos foram anestesiados com 0,08 mL/100 g de cloridrato de cetamina a 10% (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda. Santana de Parnaíba, SP - Brasil) adicionando-se cloridrato de xilazina a 2% (Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda. Santana de Parnaíba, SP - Brasil) na dosagem de 0,04 mL/100 g por via intraperitoneal, utilizando-se seringa e agulha de insulina. Os animais anestesiados foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica; a mandíbula e a maxila foram mantidas fixas com auxílio de argolas da mesa cirúrgica (Figuras 1A e 1B). Com a maxila e mandíbula fixas, o fio de algodão foi inserido no primeiro molar superior direito e mantido por 7 dias (Figuras 1C e 1D). Após este período, a ligadura foi removida (Figura 1E).

Os animais foram pesados uma vez na semana, sempre no mesmo dia, para verificar se houve perda de massa corporal; este procedimento foi realizado como meio de monitorar o animal durante o experimento, bem como para ajuste da dose de diacereína e solução salina.

Figura 1 – Procedimentos cirúrgicos



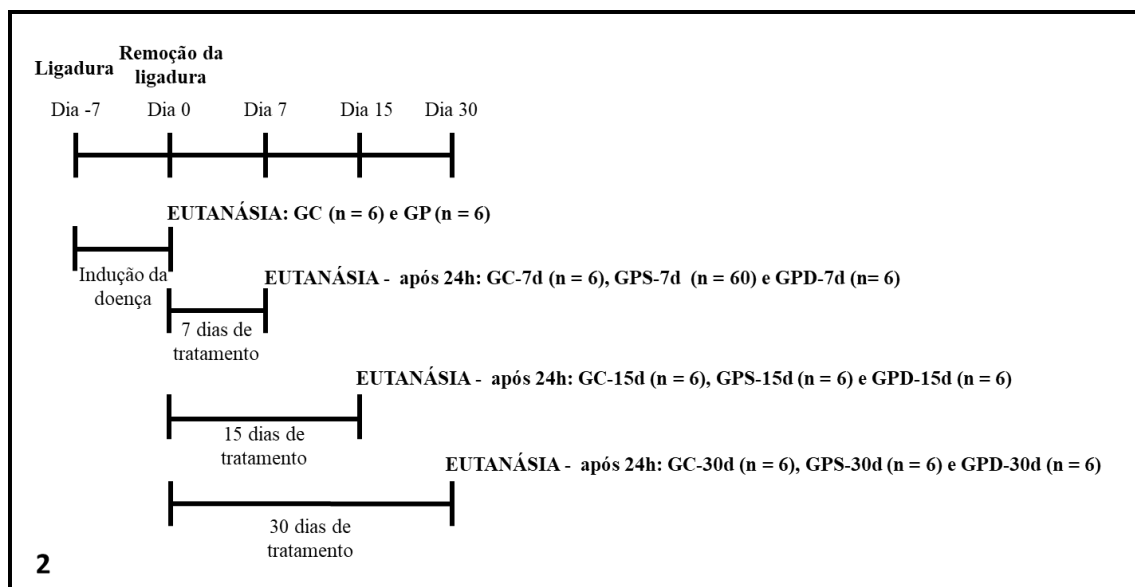
Fotografias mostrando os procedimentos cirúrgicos. **Figs. 1A e 1B** - ilustram a mesa cirúrgica com o animal posicionado e os incisivos superiores e inferiores presos por argolas metálicas, mantendo a boca do rato aberta. **Fig. 1C** - mostra o fio de algodão ao redor do colo cervical do primeiro molar superior direito, logo após sua inserção. **Fig. 1D** - evidencia o fio de algodão, anteriormente posicionado, agora situado no nível subgengival. **Fig. 1E** - mostra o sangramento marginal logo após a remoção da ligadura.

Fonte: Elaboração da autora.

No sétimo dia à colocação da ligadura, os animais foram anestesiados com 0,08 mL de cloridrato de cetamina a 10% para cada 100 g de peso corpóreo e 0,04 mL de cloridrato de xilazina a 2% para cada 100 g de peso do rato administrada por via intraperitoneal com uso de agulha e seringa de insulina; após analgesia, a ligadura foi removida. Neste momento, 6 animais com DP alocados no grupo periodontite (GP) e 6 animais sem DP, ou seja, grupo controle (GC) foram sacrificados. Imediatamente após a remoção das ligaduras, 36 animais com DP foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: GPD - grupo tratado com 100 mg/kg de peso corporal (bw) de diacereína¹⁷ administrada diariamente e grupo GPS – animais que receberam solução fisiológica estéril (cloreto de sódio 0,9%). A dose de 100 mg/Kg de bw foi baseada num estudo que demonstrou o efeito da diacereína sobre citocinas envolvidas com atividade osteoclástica¹⁸. A diacereína e a solução fisiológica foram administradas por gavagem usando uma cânula de aço inox para ratos com 54 mm de comprimento, 1,2 mm de diâmetro e esfera de 2,3 mm (BD-12, Ribeirão Preto-SP, Brasil) acoplada a uma seringa de insulina. Os ratos foram tratados durante 7, 15 e 30 dias após a remoção da ligadura. Em cada período, 18 animais foram sacrificados, portanto, 6 animais em cada grupo: GPD, GPS e GC (grupo controle, sem tratamento), de acordo com o organograma ilustrado na Figura 2.

A eutanásia dos animais de cada período foi realizada 24 horas após a última aplicação de diacereína ou solução salina com sobredose (aproximadamente, 3 vezes a dose utilizada para anestesia) de anestésico (cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilazina a 2%) por via intraperitoneal. Fragmentos da maxila foram então removidos e, imediatamente, fixados.

Figura 2 – Modelo experimental



Organograma do modelo experimental mostrando a cronologia do ensaio e seus períodos. O dia -7 corresponde ao momento da inserção da ligadura no colo cervical do primeiro molar dos animais em GP, GPS e GPD. O período transcorrido entre -7 e Dia 0 (ou seja, 7 dias) corresponde à indução da doença periodontal pelo fio de algodão mantido no primeiro molar dos ratos dos grupos com DP. No Dia 0, as ligaduras foram removidas e animais do GP foram sacrificados; os animais dos grupos GPD começaram a ter a diacereína administrada enquanto os animais do GPS começaram a receber solução salina durante 7, 15 e 30 dias. No Dia 7, GC-7d, GPD-7d e GPS-7d foram sacrificados, assim como GC-15d, GPD-15d e GPS-15d foram sacrificados após 15 dias de tratamento, e no Dia 30 GC-30d, GPD-30d e GPS-30d.

Fonte: Elaboração da autora.

4.2 Processamento Laboratorial para Inclusão em Parafina

Os fragmentos das maxilas do lado direito foram removidos e, imediatamente, imersos na solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) contendo 0,1 M de fosfato de sódio com pH 7,2, durante 72 horas. Após fixação, foi realizada descalcificação em solução de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 7%, contendo 0,5% de formaldeído, tamponada com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2. A descalcificação foi realizada com auxílio de um micro-ondas de laboratório (BioWave® Pro, PELCO), com temperatura de 28° C e

potência de 300 watts, durante aproximadamente 32 horas; a solução de EDTA foi trocada a cada 8 horas. Subsequentemente, os fragmentos da maxila foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, a partir da solução 70° GL até etanol absoluto. Após diafanização, os fragmentos foram imersos em parafina líquida no interior de uma estufa (58-60° C), durante 4 horas, com 2 trocas de parafina. Então, os fragmentos imersos em parafina líquida foram levados para a estufa à vácuo (SVAC2 Shel Lab Vacuum Oven 1.67 CU.FT., Santa Ana, CA, Estados Unidos da América) onde permaneceram, aproximadamente, durante 1 hora. Subsequentemente procedeu-se a inclusão dos fragmentos de maxila de maneira a possibilitar a obtenção de cortes sagitais (de vestibular para palatino). Após a inclusão, a microtomia foi realizada com auxílio de micrótomo (Micron, modelo HM 325) e navalhas de aço descartáveis (Leica 818, Leica Biosystems; Germany). Os cortes sagitais com 6 µm de espessura foram aderidos às lâminas de vidro; de cada bloco obteve-se, aproximadamente, 50 cortes. Cortes não seriados, com distância mínima de 100 µm, foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E) para análise morfológica e morfométrica dos seguintes parâmetros: densidade de volume (Vv) de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb), nível de inserção do epitélio juncional e mensuração da crista do processo alveolar. A reação histoquímica para detecção da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foi realizada nos cortes de maxilas para obtenção do número de osteoclastos na superfície óssea. Cortes aderidos às lâminas silanizadas foram submetidos às reações imuno-histoquímicas para detecção de IL-1 e MMP-8. As análises foram realizadas por um examinador calibrado e as mensurações foram repetidas (foram realizadas em duplicata), com um intervalo mínimo de 4 semanas.

4.3 Formas de Análise

4.3.1 Análise morfológica

A partir dos cortes corados com H&E, fragmentos de maxila contendo o primeiro molar foram analisados considerando os seguintes parâmetros: presença de células inflamatórias e extensão do processo inflamatório, organização dos feixes de fibras colágenas, presença de osteoclastos na superfície do osso alveolar, número de osteoclastos positivos ao TRAP (*Tartrate Resistant Acid Phosphate*), forma da gengiva interdentária e nível de inserção do epitélio juncional.

4.3.2 Análise morfométrica dos cortes corados com HE

Esta análise foi conduzida com auxílio de um microscópio de luz Olympus (modelo BX-51, Olympus, Tokyo, Japão) contendo uma câmera digital (DP-71, Olympus, Japão) para captura das imagens. As análises quantitativas foram realizadas com um sistema de análise de imagem da Olympus (programa Image-Pro Express 6.0, Olympus, Japão).

4.3.2.1 Mensuração do nível de inserção do epitélio juncional

Esta mensuração foi realizada a partir da distância da porção mais apical do epitélio juncional (EJ) até a junção cimento-esmalte (JCE)²⁴. Foram utilizados três cortes/animal, com intervalo mínimo de 100 µm entre eles; as mensurações foram realizadas na região distal do primeiro molar superior. As imagens da gengiva interdentária foram capturadas usando a objetiva de 4x. Com o programa de análise de imagem foi traçada uma linha entre o término mais apical do EJ até a JCE. Esta linha foi considerada como o índice de retração gengival; quando o término do epitélio juncional estava situado junto ao JCE, a distância foi considerada como sendo zero. A partir das medidas realizadas nos três cortes/animal foi obtida uma média/animal.

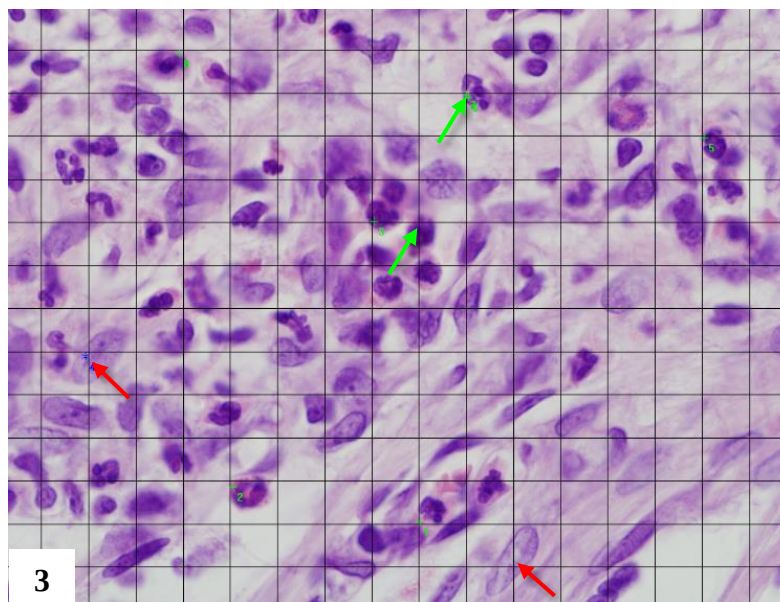
4.3.2.2 Mensuração no nível da crista do processo alveolar

Os dados foram obtidos dos 6 (seis) animais de cada grupo, de todos os períodos. A mensuração da altura do processo alveolar foi realizada a partir da distância da junção cimento-esmalte (JCE) até a região da crista óssea (PA)²⁴. As mensurações foram realizadas na região distal do primeiro molar, ou seja, processo alveolar interdentário (entre primeiro e segundo molares). Em cada animal, foram mensurados três cortes não seriados, com intervalo mínimo de 100 µm entre eles. Inicialmente, as imagens da região mostrando a crista do processo alveolar interdentário e a superfície dentária com a JCE foram capturadas em 4x. Com o programa de análise de imagens, foi traçada uma linha entre crista alveolar e junção cimento-esmalte, determinando-se assim a distância JCE-PA. A partir das medidas realizadas nos três cortes/animal foi obtida uma média/animal.

4.3.2.3 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)

Para avaliar a extensão do processo inflamatório, a proporção entre células inflamatórias (VvCI) e fibroblastos (VvFb) na lâmina própria da mucosa da gengiva interdentária, entre 1°. e 2°. molares, foi estimada nos 6 animais de cada grupo, de todos os períodos. Em cada animal, três cortes não seriados, mantendo-se intervalo mínimo de 100 µm entre os cortes, foram quantificados. Em cada corte, uma imagem foi capturada em aumento de 100x; estas imagens foram obtidas a partir da interface epitélio-lâmina própria, ou seja, do tecido conjuntivo subepitelial. Posteriormente, a imagem foi “aberta” no programa de análise de imagens, foi realizada a calibração da imagem e, subsequentemente, um sistema teste reticulado contendo 208 pontos foi sobreposto a imagem. As células inflamatórias (exibindo núcleo lobulado, irregular ou esférico com cromatina basófila) e fibroblastos (células fusiformes exibindo núcleo elíptico com cromatina frouxa) que incidiram sob os pontos de intersecção foram computados, como descrito previamente²⁴; vasos sanguíneos, fibras colágenas e espaços na matriz extracelular foram considerados como outros componentes (VvO), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Contagem de células inflamatórias e fibroblastos



Print screen da tela do computador de uma imagem da lâmina própria da mucosa gengival capturada com a objetiva de 100x. Usando o programa de análise de imagem (Image-Pro Express 6.0, Olympus), a imagem previamente capturada foi aberta e, após a calibração, um sistema teste (grade reticular) contendo 208 intersecções/pontos foi sobreposto à imagem. As intersecções incidentes sobre as células inflamatórias (setas verdes) e fibroblastos (setas vermelhas) foram computadas, enquanto os demais componentes (vasos sanguíneos, matriz extracelular, espaços dentre outros) incidentes sobre os pontos das intersecções foram computados como outras estruturas (VvO).

Fonte: Elaboração da autora.

4.3.3 Osteoclastos TRAP-positivos na superfície óssea

Como a diacereína apresenta efeito anti-IL-1, citocina envolvida com a osteoclastogênese, a distribuição e o número de osteoclastos foram avaliados na superfície do processo alveolar.

Para identificar os osteoclastos, foi utilizado o método do TRAP⁶⁵. Este método é baseado na detecção da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato, presente em osteoclastos. Os cortes foram incubados em solução preparada no momento do uso, usando o protocolo descrito por Faloni et al⁶⁶. Resumidamente, preparou-se 50 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M com pH ajustado para 5,0-5,2. Neste tampão foi adicionado 70 mg de *Fast Red Salt TR* (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) que foi dissolvido com auxílio de um agitador. A esta solução, adicionou-se 8 mg de naftol AS-BI fosfato (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) previamente dissolvido em 500 µL de N-N-dimetilformamida. A solução de aspecto “leitoso” foi agitada até se tornar homogênea e, então, foi adicionado 50 mM de tartarato de sódio. Após o tartarato de sódio ter sido dissolvido, a solução foi filtrada. Os cortes foram incubados em estufa a 37° C durante, aproximadamente, 4 horas. Subsequentemente, os cortes foram lavados em água destilada, contracorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio aquoso. Como controle de especificidade, alguns cortes foram incubados na ausência do substrato (naftol AS-BI).

O número de osteoclastos na superfície do osso alveolar ao redor do primeiro molar foi estimado usando a metodologia previamente descrita^{50,66-68}. Brevemente, foram quantificados 2 cortes não seriados por animal, com intervalo mínimo de 100 µm entre os cortes. Imagens do processo alveolar do 1º molar (da mesial à região distal) foram capturadas com a objetiva de 4x (aumento final de 65x), possibilitando a visualização completa da região; quando necessário, foram capturadas duas imagens de cada dente para se ter toda a extensão do processo alveolar. Cada imagem capturada foi aberta no sistema de análise de imagem e após a calibração do sistema, a superfície óssea correspondente ao primeiro molar superior foi delimitada e o programa forneceu a medida. Subsequentemente, com auxílio de microscópio de luz em aumento de 40x, foi realizada contagem dos osteoclastos TRAP-positivos exibindo, no mínimo, dois núcleos, situados na superfície alveolar previamente mensurada. Dessa maneira, foi obtida uma estimativa do número de osteoclastos/mm de superfície óssea. Os resultados foram submetidos à análise estatística a fim de verificar se houve diferença significativa entre os diferentes grupos e períodos.

4.3.4 Análise imuno-histoquímica para detecção de IL-1 e MMP-8

Considerando que a diacereína é um anti-IL-1, foi avaliado se o fármaco administrado sistemicamente interfere na imunoexpressão desta citocina na mucosa gengival. Além disso, avaliamos se a diacereína altera a imunoexpressão de MMP-8 após remoção da ligadura e, conseqüentemente, exerce algum papel benéfico na reparação dos tecidos periodontais. Os cortes aderidos às lâminas silanizadas foram desparafinados, hidratados e imersos em peróxido de hidrogênio a 5% para inativação da peroxidase endógena. Após lavagem em tampão fosfato de sódio com cloreto de sódio (PBS) com pH ajustado para 7,2, os cortes foram, então, submetidos ao tratamento em micro-ondas, por aproximadamente 30 minutos a temperatura de 98°C. Após o resfriamento, os cortes foram lavados em tampão PBS e, subsequentemente, incubados com soro bovino a 2% (BSA) por 20 minutos, para evitar a inespecificidade. Os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-IL-1 β produzido em coelho (1:400; Abcam, Cambridge, Massachusetts – EUA; código: ab9722) ou anticorpo primário anti-MMP-8 produzido em coelho (1:450; Abcam, Cambridge, Massachusetts – EUA; código: ab53017) durante 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS e incubados com o sistema de polímeros com peroxidase e conjugados com imunoglobulinas (IgG) anti-camundongo e anti-coelho (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, K4061; Santa Clara, California - EUA) por 1h, e então lavados com tampão PBS; a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina (ImmPACT™ DAB Vector, Burlingame, CA, USA), durante 2 minutos. Subsequentemente, os cortes foram lavados e contracolorados com hematoxilina. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune, e os cortes foram submetidos às mesmas etapas que àqueles incubados com os anticorpos primários.

Em cada corte contendo os molares, foi capturada uma área padronizada (0,015 mm²) da lâmina própria da mucosa gengival interdentária (entre 1º e 2º molares), utilizando o microscópio Olympus (modelo BX-51) em aumento de 100x. Com auxílio do programa de análise de imagens, foi computado o total de células imunopositivas em cada área. A densidade numérica de células imunopositivas (IL-1-positivas e MMP-8-positivas) foi obtida dividindo-se o número total de células pela área, obtendo-se, assim, o número de células imunopositivas/mm². Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo nos diferentes períodos.

4.4 Análise Estatística

Os resultados quantitativos dos parâmetros analisados foram submetidos à análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey; com nível de significância de $p \leq 0,05$. Para os grupos sem tratamento utilizados como parâmetro para indução ou não da doença periodontal (GP e GC), foi aplicado o teste t de Student - não paramétrico, também com nível de significância de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

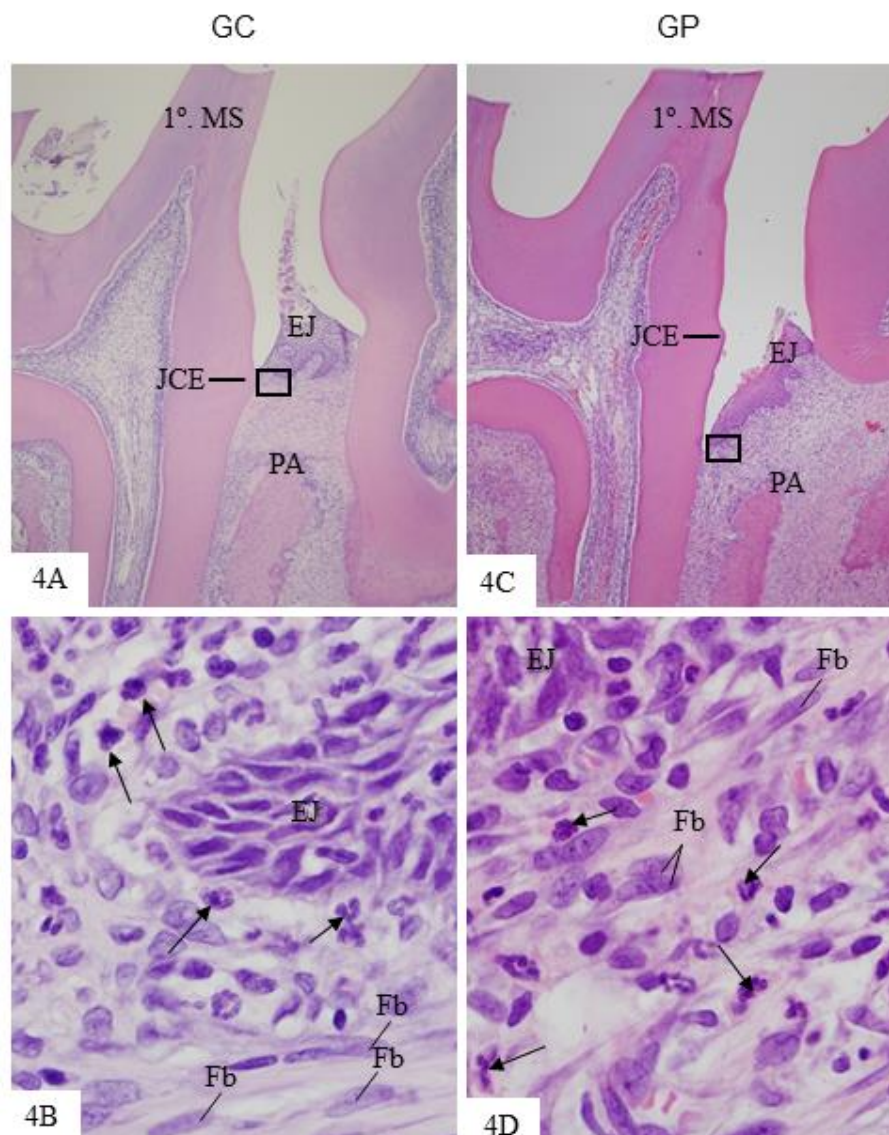
5.1 Análises Morfológica e Morfométrica

ANÁLISE MORFOLÓGICA

O periodonto da região interproximal, entre primeiro e segundo molares superiores direitos, do GC (Figura 4A) exibiu processo alveolar estendendo-se até o terço cervical das raízes dos molares. A papila interdentária apresentou formato piramidal e o epitélio juncional com sua inserção apical coincidente ao limite cemento-esmalte. A lâmina própria da mucosa gengival dos molares do GC continha algumas células inflamatórias, principalmente nas regiões próximas à interface epitélio-conjuntivo (Figura 4B). Em contraposição, nos molares do grupo GP a porção mais apical do epitélio juncional estava, invariavelmente, justaposta ao cemento acelular do terço médio radicular, ou seja, situava-se aquém da junção cemento-esmalte. Além disso, a porção mais cervical do processo alveolar alcançava o terço médio das raízes (Figura 4C). Na lâmina própria da mucosa gengival do GP, diversas células inflamatórias foram observadas entre fibroblastos (Figura 4D).

Alterações morfológicas significativas não foram observadas nos tecidos periodontais dos molares do GC, com o decorrer dos períodos. Dessa maneira, a papila interdentária manteve seu formato piramidal, o término do epitélio juncional coincidia com a junção cemento-esmalte e a crista do processo alveolar estava ligeiramente aquém do término do epitélio juncional (Figuras 5A, 5D e 5G). Em todos os períodos, os grupos GPD (Figuras 5B, 5E e 5H) e GPS (Figuras 5C, 5F e 5I) exibiram o término do epitélio juncional situado aquém da junção cemento-esmalte, justaposto à superfície do cemento acelular. Evidente perda óssea no processo alveolar interdentário foi observada; assim, a porção mais cervical do processo alveolar estava situada frequentemente junto ao terço médio das raízes.

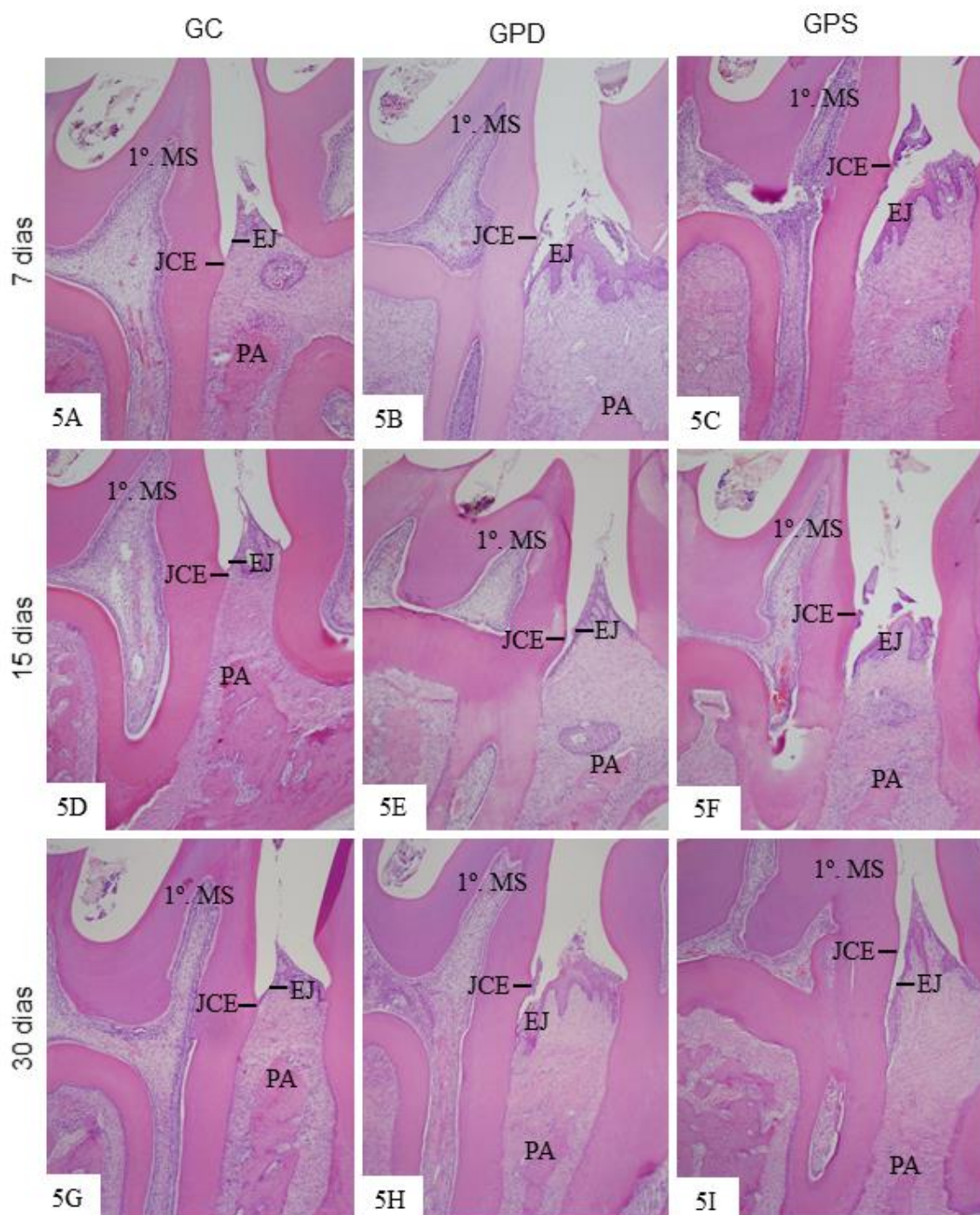
Figura 4 – Fotomicrografias de cortes em H&E (GC e GP)



Figuras 4A-4D - Fotomicrografias de cortes sagitais de molares de ratos dos grupos controle (GC) e com doença periodontal (GP). **Figs. 4A e 4B (GC)** - a Fig. 4A mostra a região interproximal, entre primeiro e segundo molares. Note que o a porção mais apical do epitélio juncional (EJ) é coincidente à junção cimento-esmalte (JCE) e a crista do processo alveolar (PA) atinge o terço cervical das raízes. **Fig. 4B** – detalhe da área delimitada em 4A, uma porção da lâmina própria da mucosa gengival, mostrando algumas células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb). EJ, epitélio juncional. **Figs. 4C e 4D (GP)** – Em 4C, região interproximal entre primeiro e segundo molares, a porção mais apical do epitélio juncional (EJ) está situado aquém da junção cimento-esmalte (JCE). Na **Fig. 4D**, área demarcada em 4C, diversas células inflamatórias (setas), principalmente neutrófilos e macrófagos são observados na lâmina própria, entre os fibroblastos (Fb). H&E. Figs. 4A e 4C: 28x; Figs. 4B e 4D: 575x.

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 5 – Fotomicrografias em menor aumento de cortes em H&E (GC, GPD e GPS)



Figuras 5A-5I - Fotomicrografias de cortes sagitais de molares de ratos dos grupos controle (GC), com doença periodontal tratados com a diacereína (GPD) e com doença periodontal tratados com solução salina (GPS) durante 7, 15 e 30 dias. As fotomicrografias mostram a região interproximal, entre primeiro e segundo molares superiores do lado direito. **Figs. 5A, 5D e 5G** - No GC, a porção mais apical do epitélio juncional (EJ) é coincidente à junção cimento-esmalte (JCE) e a crista do processo alveolar (PA) está situada subjacente à mucosa gengival, no terço cervical das raízes. **Figs. 5B, 5C, 5E, 5F, 5H e 5I** - Nos grupos com doença periodontal tratados com diacereína ou solução fisiológica o término do epitélio juncional (EJ) está localizado aquém da junção cimento-esmalte (JCE) e a porção mais cervical do processo alveolar (PA) está situada no terço médio das raízes. H&E. 28x.

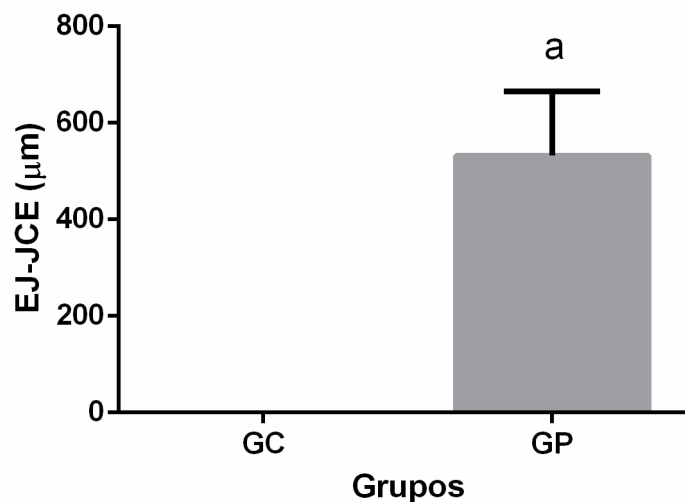
Fonte: Elaboração da autora.

5.1.1 Mensuração do nível de inserção do epitélio juncional

De acordo com a Figura 6, no GC o término do epitélio juncional estava situado na junção cimento-esmalte, sendo, portanto, atribuído o valor zero à distância EJ-JCE. No grupo GP, a porção mais apical do epitélio juncional estava aquém da junção cimento-esmalte, possuindo diferença estatística significativa em relação a GC ($p < 0,0001$).

Em todos os períodos, o término do epitélio juncional estava situado na junção cimento-esmalte dos molares do GC (Figura 7). Em todos os períodos, a porção mais apical do epitélio juncional dos molares nos grupos GPD e GPS apresentou-se aquém da junção cimento-esmalte, com diferença significativa em comparação ao GC ($p < 0,0001$). Em contrapartida, GPD e GPS não possuíram diferença estatisticamente significativa aos 7 ($p = 0,0528$), 15 ($p = 0,6556$) e após 30 ($p = 0,9999$) dias de tratamento. Além disso, não houve diferença significativa em nenhum dos grupos ao longo do tempo.

Figura 6 – Distância do epitélio juncional à junção cimento-esmalte

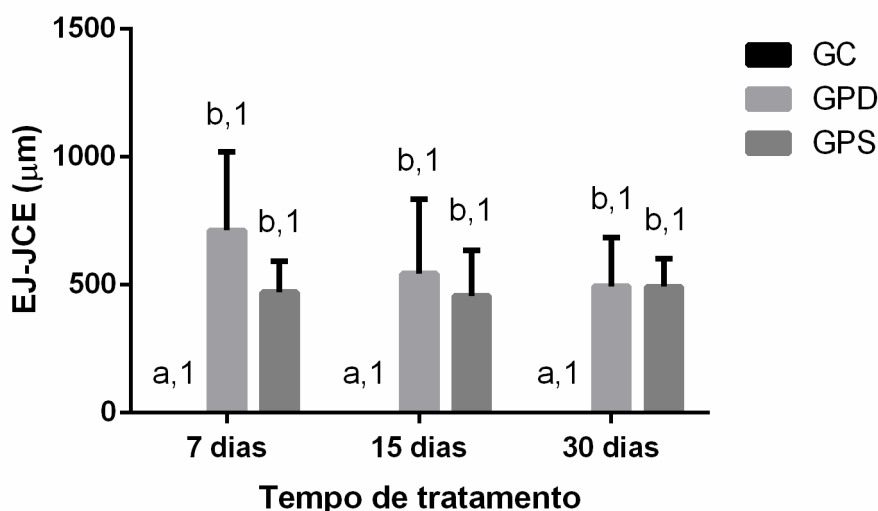


Mensuração (em micrômetros) da distância do nível de inserção do epitélio juncional em relação à junção cimento-esmalte (EJ-JCE) do periodonto de ratos dos grupos GC e GP.

a = diferença significativa em relação a GC (teste não paramétrico t Student; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 7 - Distância do epitélio juncional à junção cimento-esmalte



Mensuração (em micrômetros) da distância do nível de inserção do epitélio juncional em relação à junção cimento-esmalte (EJ-JCE) do periodonto de ratos dos grupos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias de tratamento.

A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significativas não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

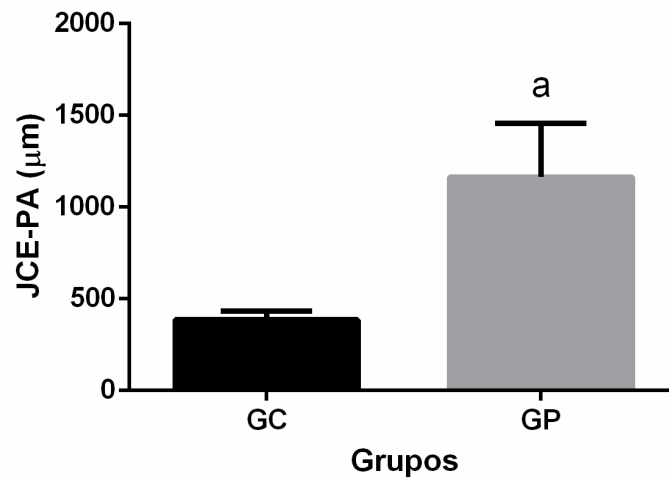
Fonte: Elaboração da autora.

5.1.2 Mensuração da distância da junção cimento-esmalte à crista do processo alveolar

Como pode-se observar na Figura 8, GP demonstrou um aumento significativo na distância linear entre junção cimento-esmalte e processo alveolar (JCE-PA), quando comparado a GC ($p < 0,0001$).

A análise dos dados obtidos com o tratamento (Figura 9) revelou que, em todos os períodos, os grupos GPD e GPS exibiram valores significativamente maiores da distância PA-JCE em comparação aos do grupo GC diferenças significantes em relação ao grupo GC ($p \leq 0,0062$). Diferenças significantes não foram detectadas entre os grupos GPD e GPS aos 7 ($p = 0,7937$), 15 ($p = 0,5259$) e 30 ($p = 0,3395$) dias. Com o decorrer do tempo de tratamento, GPD apresentou uma diminuição significativa de 7 para 15 dias ($p = 0,0029$) e de 7 para 30 dias ($p = 0,0178$) enquanto, de 15 para 30 dias, nenhuma diferença significativa foi detectada ($p = 0,7881$). Os grupos GPS e GC não tiveram alterações estatisticamente significantes em relação ao tempo de tratamento.

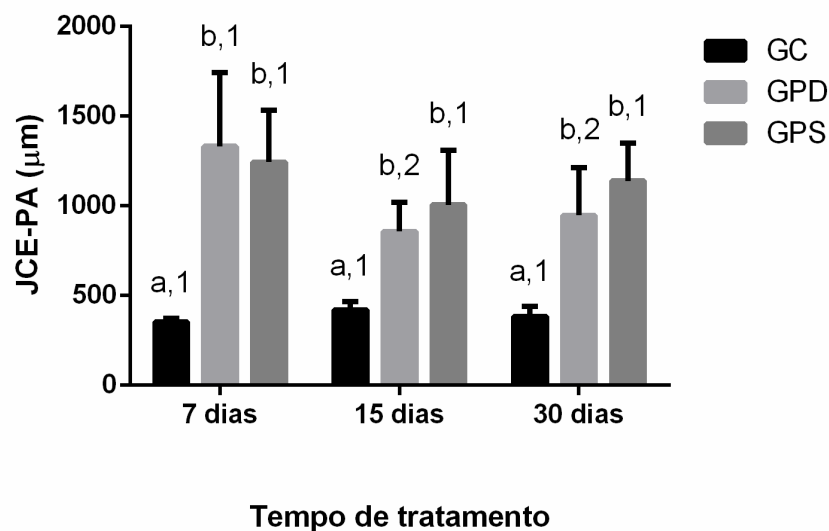
Figura 8 - Distância da junção cimento-esmalte à crista óssea do processo alveolar



Mensuração (em micrômetros) da distância da crista óssea do processo alveolar em relação à junção cimento-esmalte (JCE-PA) do periodonto de ratos dos grupos GC e GP.
a = diferença significativa em relação a GC (teste não paramétrico t Student; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 9 -Distância da junção cimento-esmalte à crista óssea do processo alveolar



Mensuração (em micrômetros) da distância da crista óssea do processo alveolar em relação à junção cimento-esmalte (JCE-PA) do periodonto de ratos dos grupos GC, GPD e GPS aos 7, 15 e 30 dias. A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significantes não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

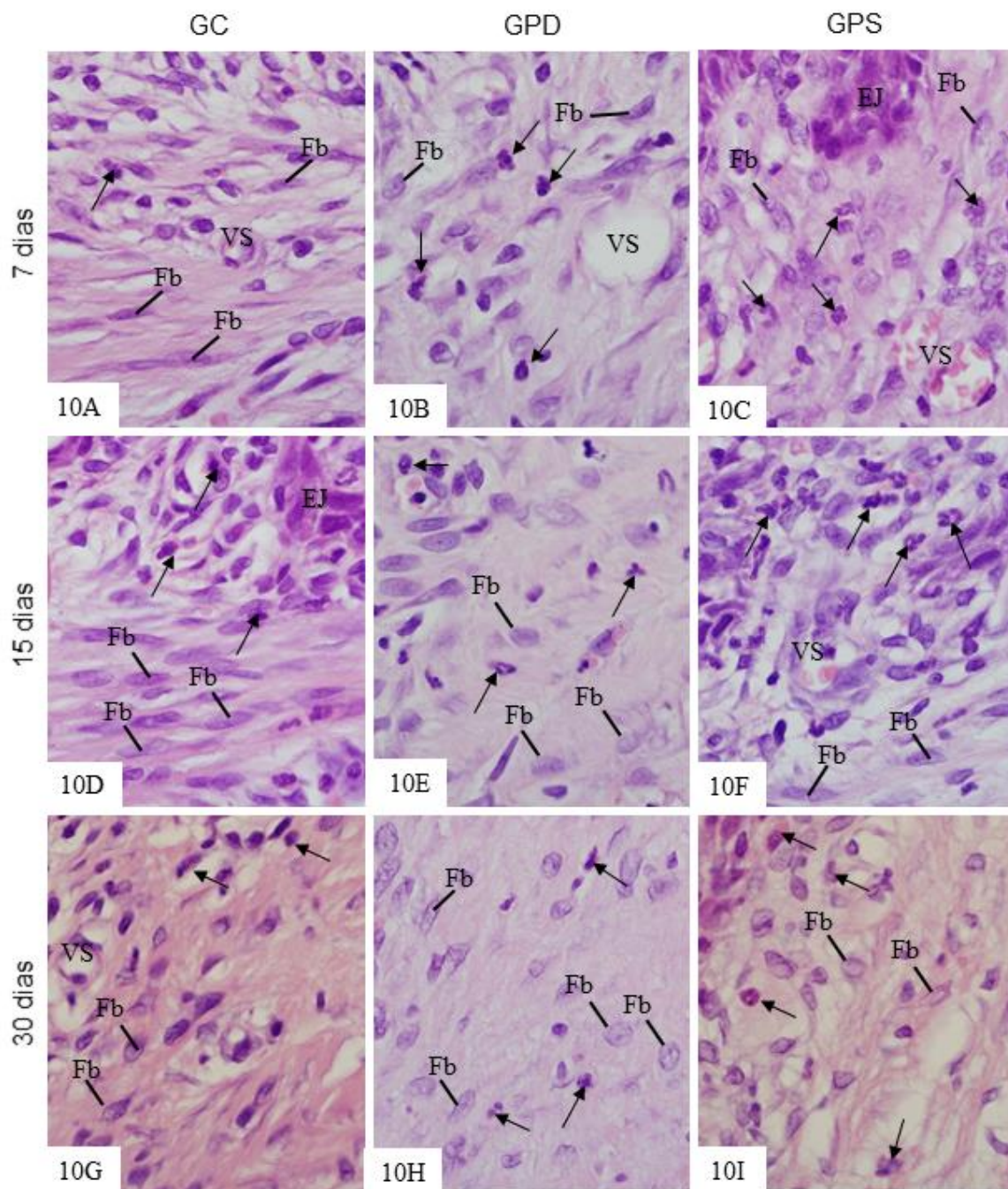
Fonte: Elaboração da autora.

5.1.3 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)

A análise morfológica do tecido conjuntivo subepitelial (lâmina própria) da mucosa gengival dos molares do GC revelou a presença de fibroblastos imersos numa matriz extracelular contendo fibras colágenas e substância fundamental amorfa em proporções equivalentes. Além disso, algumas células inflamatórias, principalmente, neutrófilos foram também observados (Figuras 10A, 10D e 10G). Nos ratos dos grupos GPD (Figuras 10B, 10E e 10H) e GPS (Figuras 10C, 10F e 10I), o tecido conjuntivo da mucosa gengival apresentava conteúdo celular aparentemente mais numeroso, particularmente o GPS, nos diferentes períodos. Além disso, observou-se uma desorganização dos componentes celulares e fibrilares, em particular a disposição de fibroblastos entre feixes de fibras colágenas.

A análise quantitativa (Figuras 11 e 12) revelou que GP apresentou um aumento significativo na VvCI ($p < 0,0001$), enquanto a VvFb reduziu significativamente ($p = 0,0043$) em comparação ao GC. Em todos os períodos, nenhuma diferença significativa foi detectada na VvCI entre os grupos GPD e GC ($p \geq 0,0986$), enquanto para GPS os valores de VvCI foram significativamente superiores aos grupos GPD (7 e 30 dias: $p < 0,0001$; 15 dias: $p = 0,0017$) e GC (7 e 30 dias: $p < 0,0001$; 15 dias: $p = 0,0098$). Entre os períodos, GC não apresentou alterações significantes na VvCI ($p \geq 0,3483$), bem como o GPD ($p \geq 0,1063$). Porém, GPS exibiu uma diminuição significativa de 7 para 15 dias ($p < 0,0001$) e de 7 para 30 dias ($p = 0,0005$); não houve diferença estatística na VvCI entre os períodos de 15 e 30 dias ($p = 0,2400$) conforme mostra a Figura 12A. De acordo com a Figura 12B, significantes diferenças na VvFb não foram observadas entre os grupos, aos 7 e 15 dias. Aos 30 dias, os grupos GPD e GPS não apresentaram diferenças significantes na frequência de fibroblastos ($p = 0,9930$), que foram significativamente inferiores ao observado no GC ($p = 0,0119$ e $p = 0,0088$, respectivamente). Com o decorrer do tempo, nenhuma diferença significativa foi observada na VvFb nos grupos.

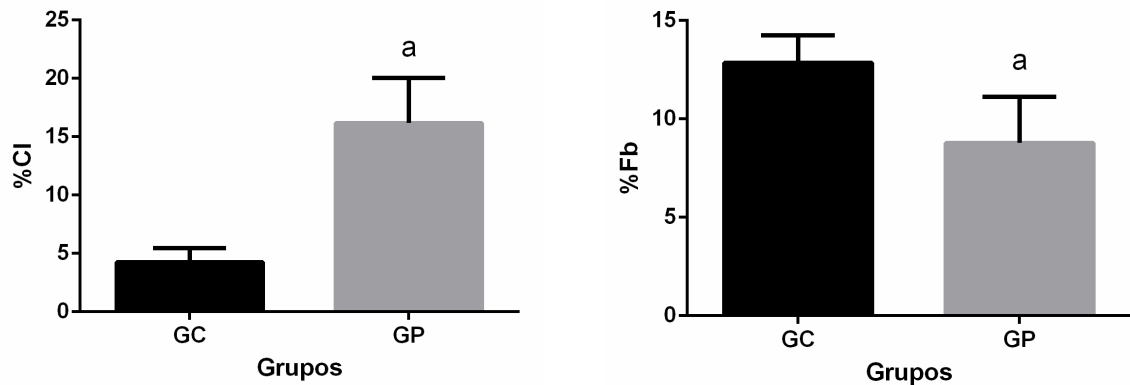
Figura 10 – Fotomicrografias em maior aumento de cortes em H&E (GC, GPD e GPS)



Figuras 10A-10I Fotomicrografias mostrando porções da lâmina própria da mucosa gengival de molares de ratos dos grupos controle (GC), com doença periodontal tratados com a diacereína (GPD) e com doença periodontal tratados com solução salina (GPS) durante 7, 15 e 30 dias. No GC (Figs. 10A, 10D e 10G), algumas células inflamatórias (setas) são observadas, principalmente na porção da lâmina própria subjacente ao epitélio juncional (EJ); os fibroblastos (Fb) apresentam-se entre feixes de fibras colágenas e vasos sanguíneos (VS). Nos grupos GPD (Figs. 10B, 10E e 10H) e GPS (Figs. 10C, 10F e 10I), as células inflamatórias (setas) aparecem distribuídas entre os fibroblastos (Fb), os quais se dispõem sem um arranjo definido. VS, vasos sanguíneos. H&E. 460x.

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 11 - Densidade de volume de células inflamatórias e de fibroblastos (GC e GP)



Densidade de volume (Vv) de células inflamatórias (%CI) e de fibroblastos (%Fb) na lâmina própria da mucosa gengival de ratos dos grupos GC GP (teste t de Student não paramétrico; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 12 - Densidade de volume de células inflamatórias e de fibroblastos (GC, GPD e GPS)

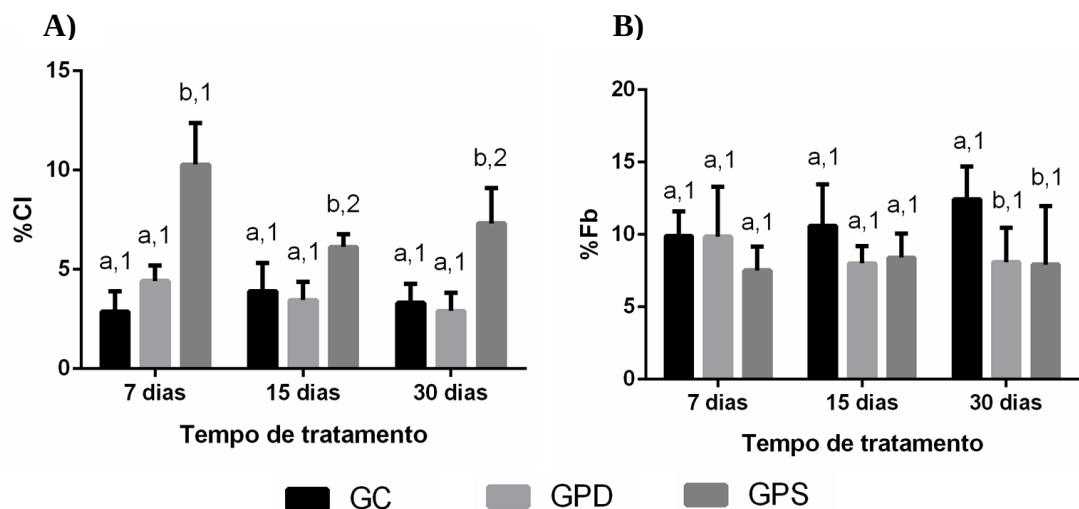


Figura 12. A) Densidade de volume (Vv) de células inflamatórias (%CI) na lâmina própria da mucosa gengival de ratos dos grupos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias. **B)** Densidade de volume (Vv) de fibroblastos (%Fb) na lâmina própria da mucosa gengival de ratos dos grupos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias.

A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significativas não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

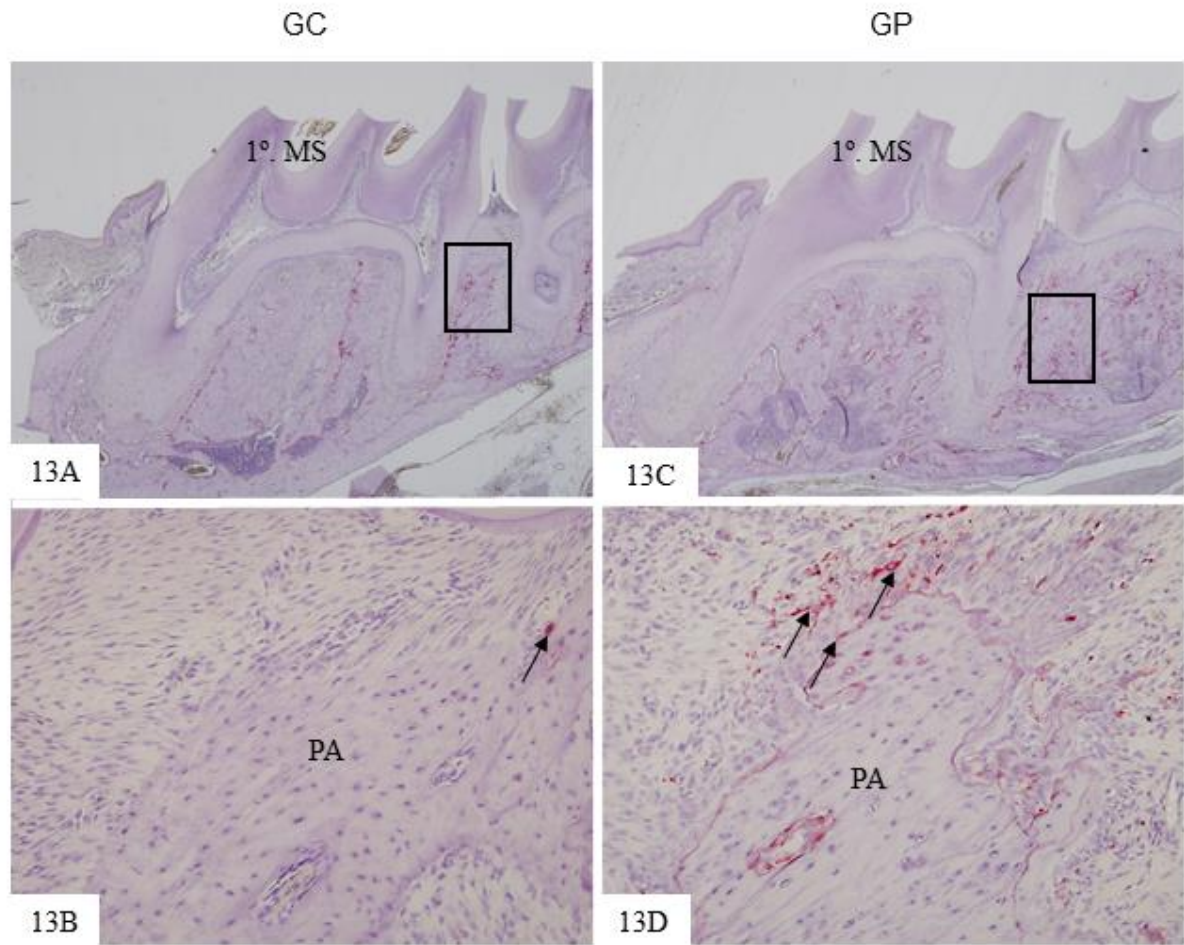
Fonte: Elaboração da autora.

5.2 Número de Osteoclastos TRAP-positivos

Os cortes submetidos ao método do TRAP revelaram osteoclastos com citoplasma fortemente reativo à enzima fosfatase ácida, observado em vermelho. Osteoclastos TRAP-positivos foram observados na superfície óssea do processo alveolar de todos os grupos (Figuras 13A-13D; 14A-14I).

A análise quantitativa (Figuras 15 e 16) mostrou um aumento significativo no número de osteoclastos TRAP-positivos em GP comparado a GC ($p = 0,0051$). Aos 7 e 15 dias de tratamento, o número de osteoclastos no grupo GPD foi significativamente menor em comparação ao GPS (7 dias: $p = 0,0091$; 15 dias $p < 0,0001$). Aos 30 dias, diferenças significantes não foram verificadas entre o grupo GPD comparado a GPS e GC, porém diferença significativa foi observada entre os grupos GC e GPS ($p = 0,0186$). A análise de cada grupo com o decorrer do tratamento revelou que os grupos GPD e GC não apresentaram diferenças significantes. No grupo GPS, houve um aumento significativo no número de osteoclastos de 7 para 15 dias ($p = 0,0091$), enquanto de 15 para 30 dias houve uma redução significativa ($p = 0,0213$); diferenças significantes não foram observadas entre os períodos de 30 e 7 dias ($p = 0,9433$).

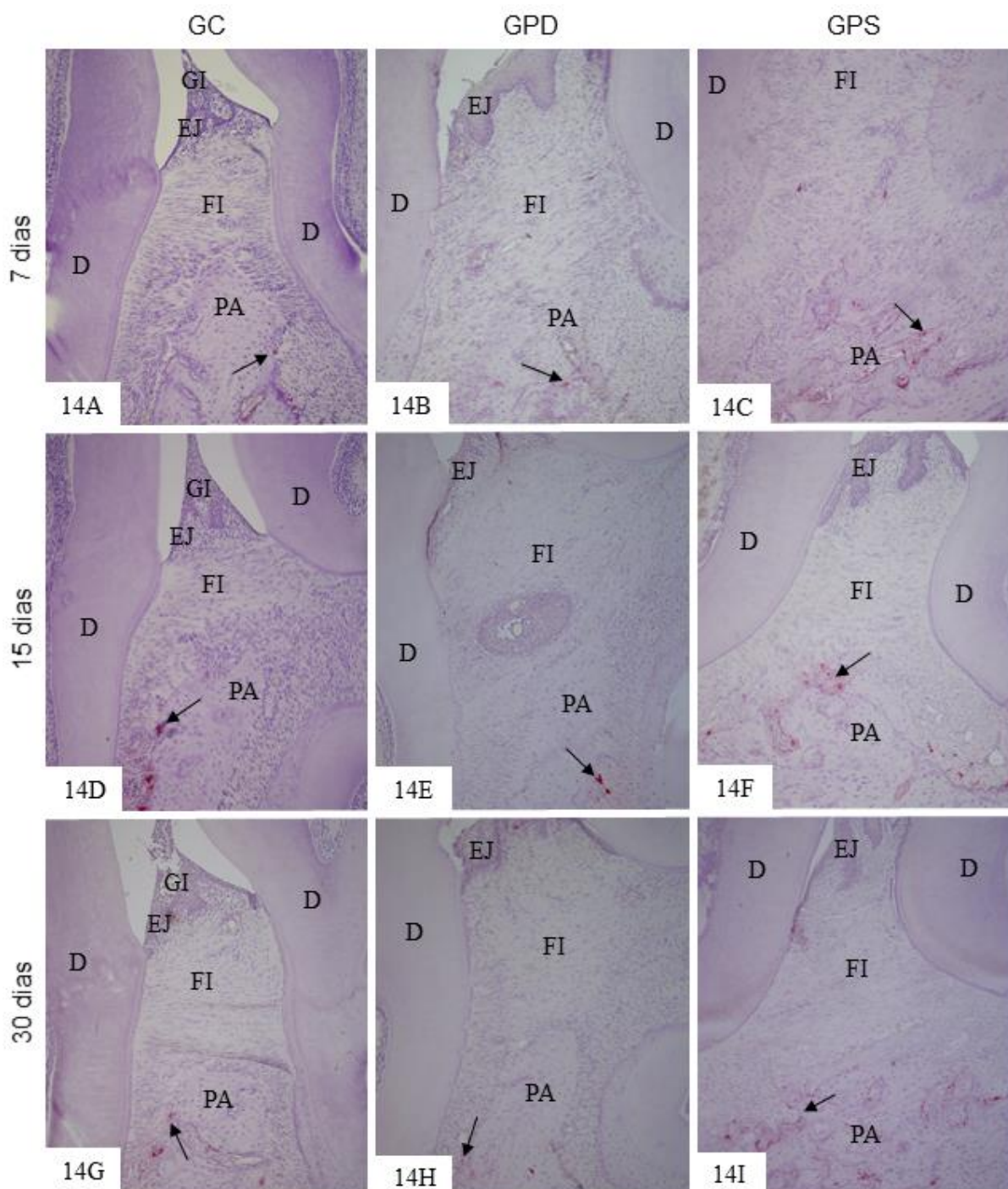
Figura 13 – Fotomicrografias de cortes submetidos ao método TRAP (GC e GP)



Figuras 13A-13D – Fotomicrografias de cortes sagitais de molares de ratos dos grupos controle (GC) e com doença periodontal (GP). Os cortes foram submetidos ao método TRAP e contraincorados com hematoxilina. **Figs. 13A (GC) e 13C (GP)** - osteoclastos TRAP-positivos (em vermelho) adjacentes à superfície óssea são observados por toda extensão do processo alveolar (PA), ao redor do primeiro molar. 5,8x As Figs. 13B e 13D, áreas demarcadas em 13A e 13C respectivamente, mostram porções do processo alveolar (PA) da região interproximal com osteoclastos positivos ao TRAP (setas). Note que no grupo GP (Fig. 13D) diversas células em vermelho (setas) são observadas nas proximidades do processo alveolar. 90x

Fonte: Elaboração da autora.

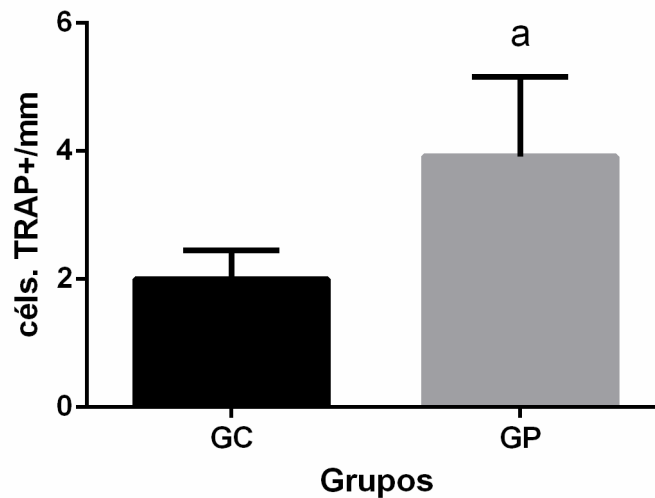
Figura 14 – Fotomicrografias de cortes submetidos ao método TRAP (GC, GPD e GPS)



Figuras 14A-14I – Fotomicrografias de cortes sagitais de molares de ratos dos grupos controle (GC), doença periodontal tratados com a diacereína (GPD) e com doença periodontal tratados com solução salina (GPS) durante 7, 15 e 30 dias. Os cortes foram submetidos ao método TRAP e contracolorados com hematoxilina. As fotomicrografias mostram porções do processo alveolar (PA) interproximal, entre o 1º e o 2º molares. Note que no grupo GC (Figs. 14A, 14D e 14G) a crista do processo alveolar (PA) está recoberta pelas fibras interdentárias (FI); poucos osteoclastos (setas) são observados na superfície óssea. Nos grupos GPD (Figs. 14B, 14E e 14H), diversos osteoclastos (setas), principalmente no grupo GPS (Figs. 14C, 14F e 14I), estão presentes junto à superfície irregular do processo alveolar. GI, gengiva interdental; EJ, epitélio juncional; D, dentina. 40x.

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 15 - Osteoclastos TRAP-positivos (GC e GP)

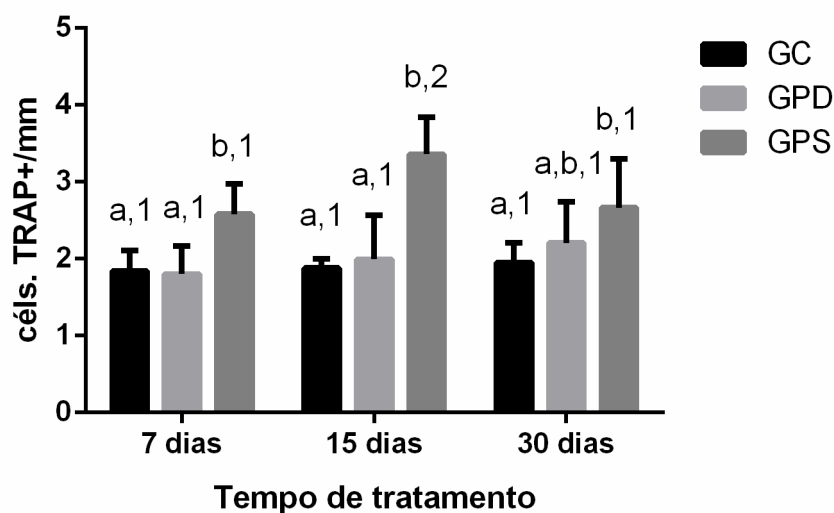


Número de osteoclastos TRAP-positivos por milímetro de superfície do processo alveolar do primeiro molar de ratos dos grupos GC e GP.

a = diferença significativa em relação a GC (teste não paramétrico t Student; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 16 - Osteoclastos TRAP-positivos (GC, GPD e GPS)

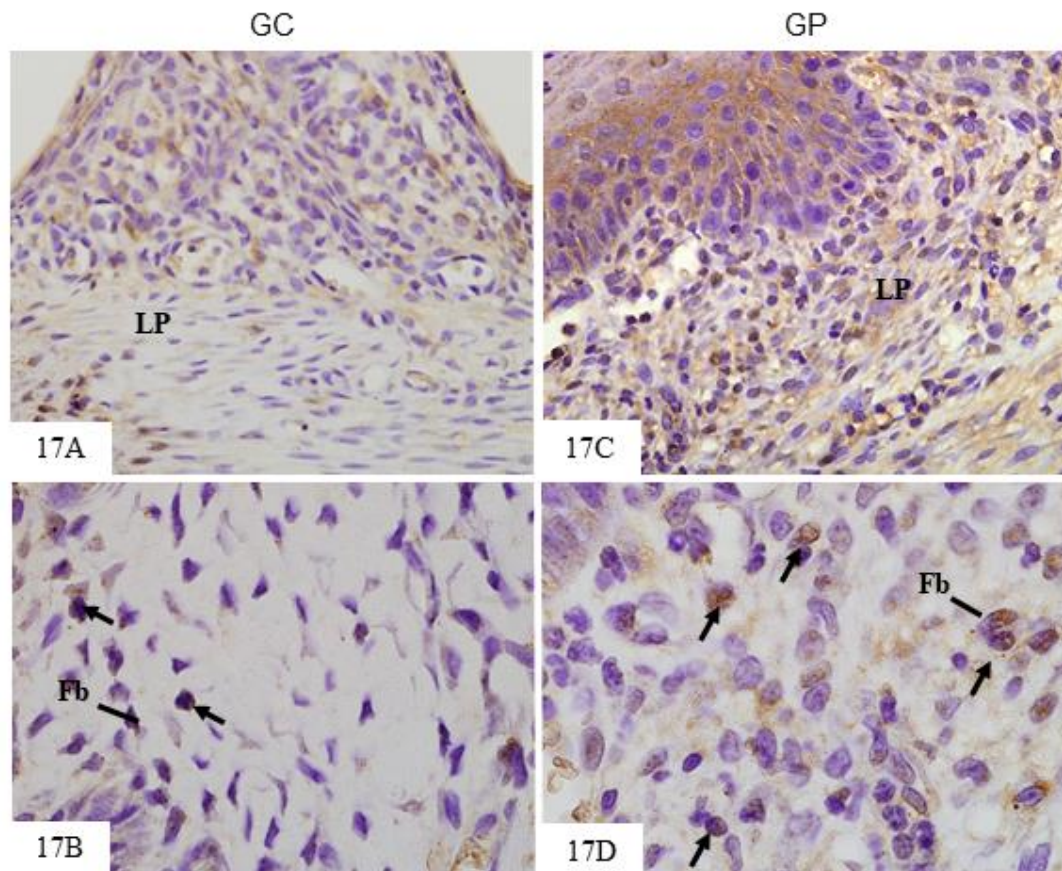


Número de osteoclastos TRAP-positivos por mm de superfície linear do processo alveolar do primeiro molar de ratos dos grupos dos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias de tratamento.

A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significativas não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

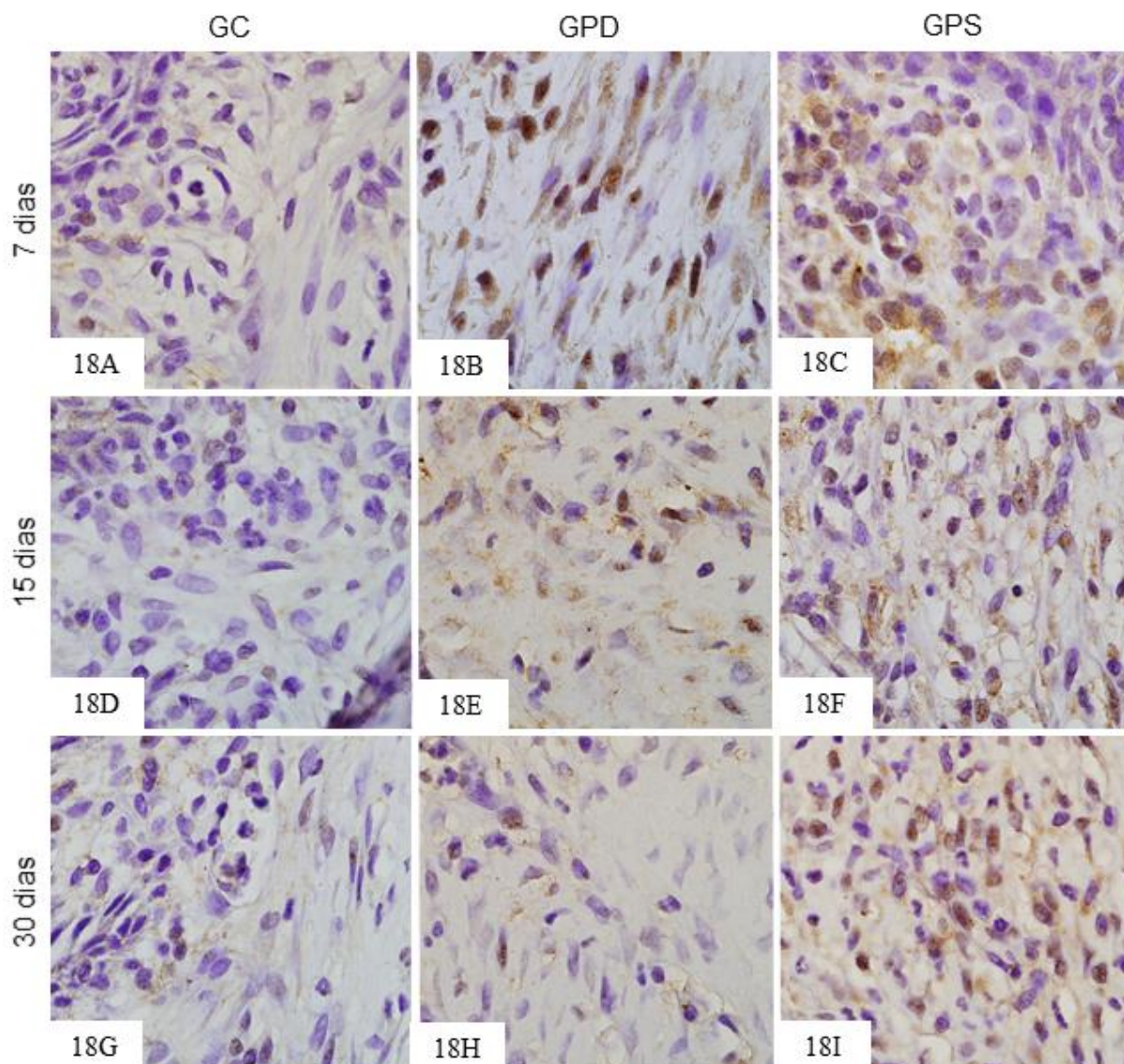
Figura 17 – Imuno-histoquímica (IL-1 β): GC e GP



Figuras 17A-17D – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos dos grupos GC e GP mostrando porções de gengiva interproximal, entre os 1º e 2º molares. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de IL-1 β e contracordados com hematoxilina. **Figs. 17A (GC) e 17C (GP)** – células imunopositivas (em castanho) são observadas na lâmina própria (LP). Note que poucas células exibem positividade (setas) no GC em comparação ao GP. 227x. As Figs. 17B e 17D mostram em aumento maior a presença de fibroblastos (Fb) e células inflamatórias (setas) imunopositivas. 511x.

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 18 - Imuno-histoquímica (IL-1 β): GC, GPD e GPS



Figuras 18A-18I – Fotomicrografias mostrando porções da gengiva interdentária, entre os 1º e 2º molares de ratos dos grupos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de IL-1 β e contracordados com hematoxilina. No GC, poucas células imunopositivas (em castanho) são observadas na lâmina própria, em todos os períodos. Aos 7 dias de tratamento com diacereína (GPD), acentuada marcação é observada na lâmina própria em comparação aos períodos de 15 (Fig. 18E) e 30 (Fig. 18H) dias. Figs. 18C, 18F e 18I (GPS) - diversas células imunopositivas são observadas na lâmina própria da mucosa gengival em todos os períodos. 394x.

Fonte: Elaboração da autora.

5.3 Detecção de IL-1 β na mucosa gengival

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-1 β mostraram fraca positividade na lâmina própria da mucosa gengival dos ratos do GC (Figuras 17A e 17B). Em contraposição, diversas células inflamatórias e alguns fibroblastos apresentaram imunopositividade à IL-1 β após a indução da doença periodontal (Figuras 17C e 17D). Aos 7, 15 e 30 dias, a mucosa gengival dos ratos do GC mostrou poucas células imunopositivas à IL-1 β na lâmina própria (Figuras 18A, 18B D 18G). No GPD, uma evidente imunomarcacão na mucosa gengival foi observada após 7 dias de tratamento (Figuras 18B). No entanto, poucas células positivas foram observadas nas amostras do GPD após 15 e 30 dias (Figuras 18E e 18H). Em contraste, no GPS evidente imunomarcacão foi observada na lâmina própria da mucosa gengival em todos os períodos (Figuras 18C, 18F e 18I).

De acordo com a Figura 19, a mucosa gengival dos animais do GP mostrou um significativo aumento no número de células imunopositivas à IL-1 em comparação ao GC ($p < 0,0001$).

A análise do tratamento (Figura 20) revelou que, aos 7 dias, o número de células imunopositivas foi significativamente menor nos animais do grupo GPD em comparação ao GPS ($p < 0,0001$), embora ambos grupos mostraram valores maiores em comparação ao GC ($p < 0,0001$). Após 15 e 30 dias, diferenças significantes não foram observadas entre os grupos GPD e GC ($p = 0,4188$ e $p = 0,1771$, respectivamente). Em contraposição, a imunoexpressão na mucosa gengival dos animais do GPS, em todos os períodos, foi significante maior do que nos grupos GPD ($p < 0,0001$) e GC (7 e 15 dias: $p \leq 0,0001$; 30 dias: $p = 0,0004$). De 7 para 15 dias, uma significativa redução na quantidade de células positivas à IL-1 foi observada no GPD ($p < 0,0001$). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada no grupo GPD entre os períodos de 15 e 30 dias ($p = 0,5815$).

Figura 19 - Imunoexpressão de IL-1 β (GC e GP)

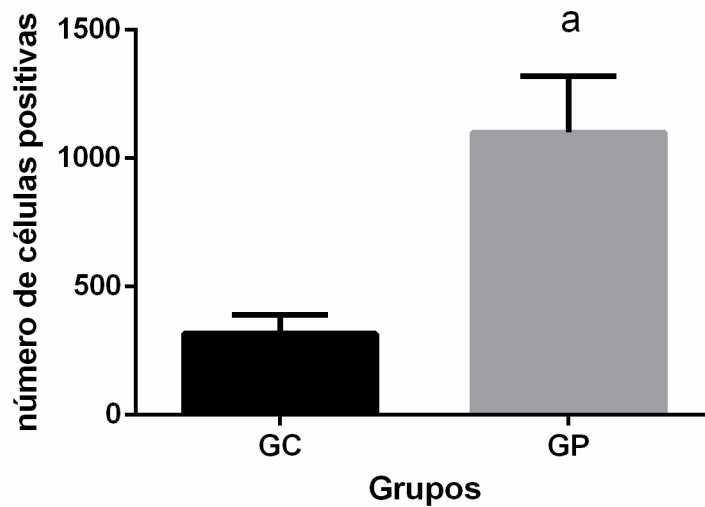


Gráfico representando o número de células imunopositivas para IL-1 β na lâmina própria da mucosa gengival dos animais dos grupos GC e GP.

a = diferença significativa em relação a GC (teste t de Student não paramétrico; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 20 - Imunoexpressão de IL-1 β (GC, GPD e GPS)

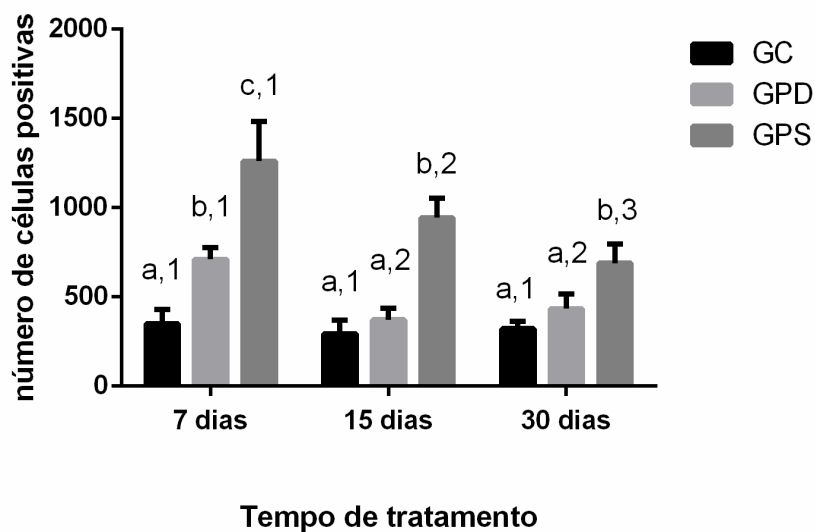


Gráfico representando o número de células IL-1 β -imunopositivas/mm² na lâmina própria da mucosa gengival dos animais dos grupos GC, GPD e GPS, nos períodos de 7, 15 e 30 dias de tratamento. A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significativas não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

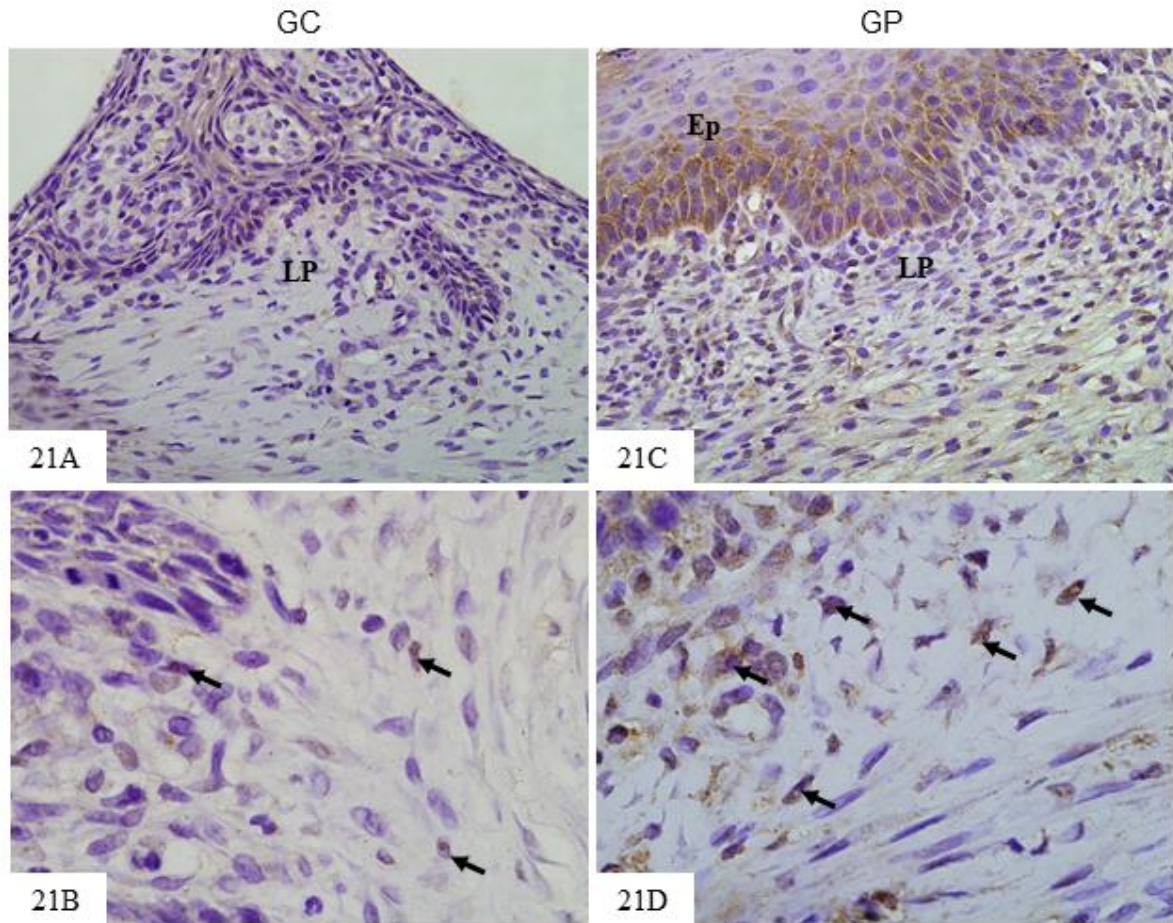
5.4 Imunopositividade da MMP-8 na mucosa gengival

A detecção imuno-histoquímica da MMP-8 revelou poucas células imunopositivas (em castanho) na lâmina própria da mucosa gengival dos ratos do GC, em todos os períodos (Figuras 21A e 21C). Nos animais dos grupos GP (Figuras 21C e 21D), GPD (Figuras 22B, 22E e 22H) e GPS (Figuras 22C, 22F e 22I) a imunoexpressão foi mais acentuada em comparação ao GC.

Como ilustra a Figura 23, a lâmina própria da gengiva dos animais do GP apresentou um aumento estatisticamente significativo no número de células MMP-8-positivas, quando comparado a GC ($p < 0,0001$).

Após 7 e 15 dias de tratamento (Figura 24), os animais do GPD exibiram menor densidade numérica de células imunopositivas em comparação ao GPS ($p < 0,0001$), apesar dos valores serem significativamente superiores quando comparados aos do grupo GC ($p < 0,0001$). No entanto, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos GPD e GC ($p = 0,4582$) aos 30 dias. Neste período, a imunoexpressão de MMP-8 foi significativamente maior na lâmina própria da mucosa gengival dos animais do GPS em comparação aos grupos GPD e GC ($p < 0,0001$). De 7 para 15 dias, GPD não apresentou alterações significantes no número de células imunopositivas ($p = 0,7866$), no entanto, quando ambos os períodos foram comparados aos 30 dias de tratamento, houve uma redução significativa na imunoexpressão de MMP-8 ($p = 0,0021$ e $p = 0,0003$). No grupo GPS, uma diminuição significativa no número de células imunopositivas foi detectada somente no período de 30 dias em comparação aos 7 dias ($p = 0,0054$). Diferenças significantes na imunoexpressão de MMP-8 não foram detectadas no GC com o decorrer do tempo ($p \geq 0,4544$).

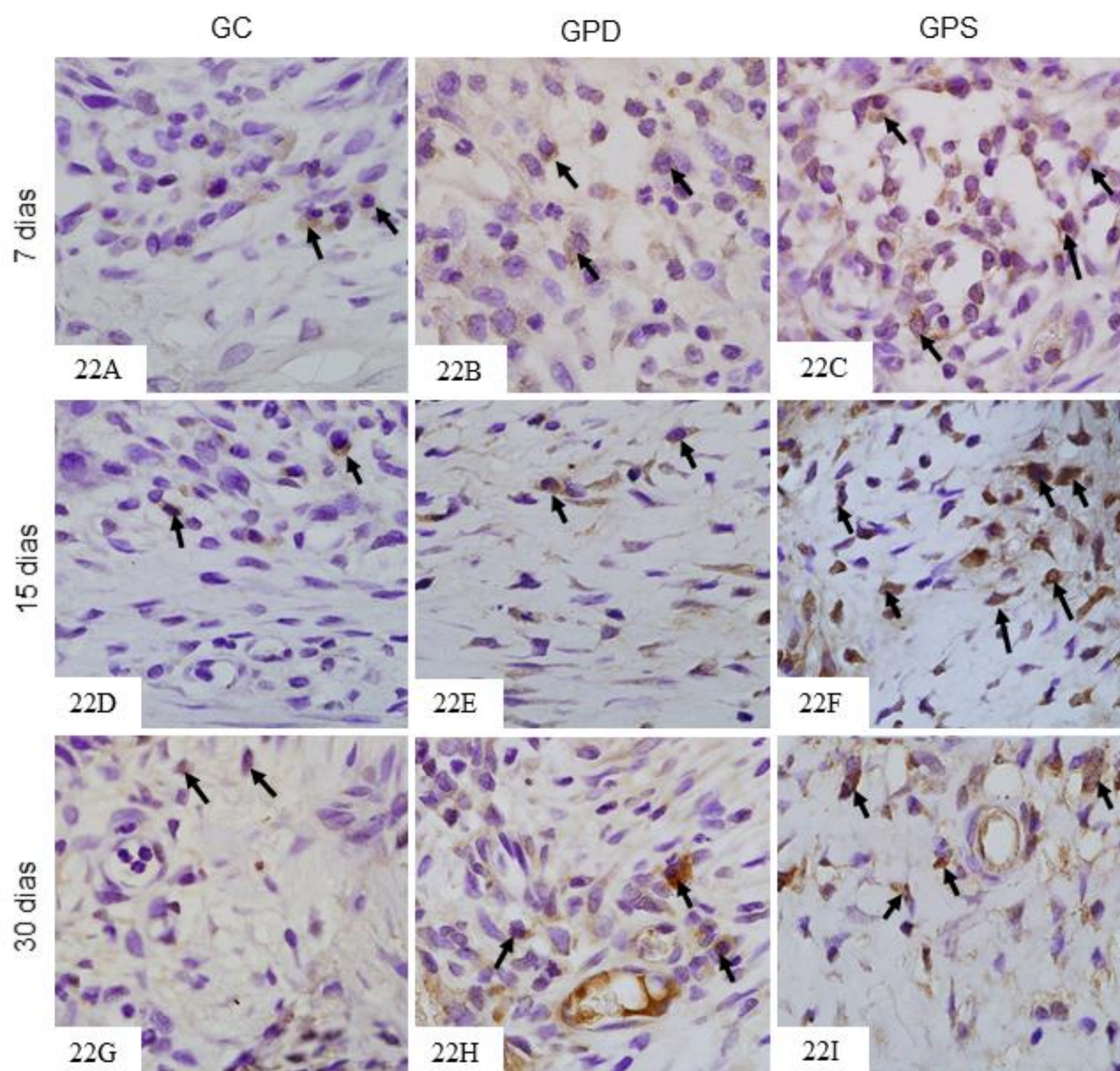
Figura 21 – Imuno-histoquímica (MMP-8): GC e GP



Figuras 21A-21D – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas de ratos dos grupos GC e GP mostrando porções de gengiva interproximal, entre os 1º e 2º molares. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de MMP-8 e contracolorados com hematoxilina. **Figs. 21A (GC) e 21C (GP)** – células imunopositivas (em castanho) são observadas na lâmina própria (LP) da mucosa gengival. 185x. Nas Figs. 21B e 21D, observa-se a presença de células imunopositivas para MMP-8 em aumento maior. Pode-se observar que no grupo GP (Fig. 21D) maior quantidade de células imunopositivas (setas) são observadas na lâmina própria. Ep: epitélio da mucosa gengival. 470x

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 22 – Imuno-histoquímica (MMP-8): GC, GPD e GPS



Figuras 22A-22I – Fotomicrografias mostrando porções da gengiva interdentária, entre os 1º e 2º molares de ratos dos grupos GC, GPD e GPS, aos 7, 15 e 30 dias. Os cortes foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para detecção de MMP-8 e contracolorados com hematoxilina. Figs. 22A, 22D e 22G - no GC, escassas células positivas à MMP-8 (castanho) são observadas na lâmina própria. Nos grupos GPD (Figs. 22B, 22E e 22H) e GPS (Figs. 22C, 22F e 22I) diversas células mostram positividade, diminuindo com o decorrer do tempo. 388x

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 23 - Imunoexpressão de MMP-8 (GC e GP)

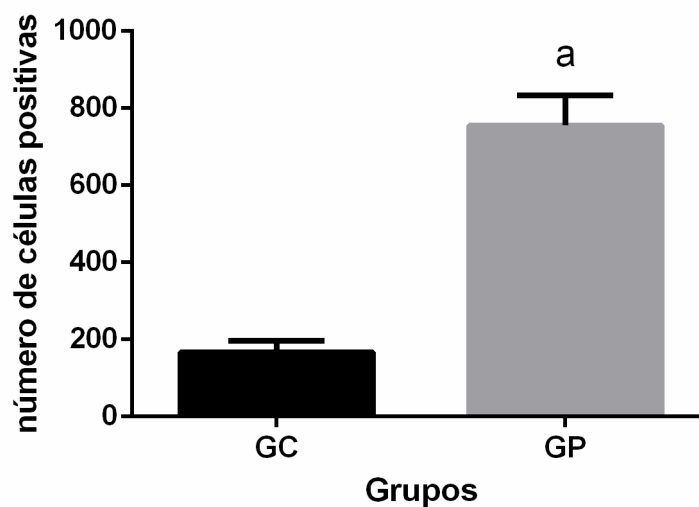


Gráfico representando o número de células MMP-8-imunopositivas/mm² (expressos os valores da média) na lâmina própria da mucosa gengival dos animais dos grupos GC e GP.

a = diferença estatística significativa em relação a GC (teste t de Student não paramétrico; $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 24 - Imunoexpressão de MMP-8 (GC, GPD e GPS)

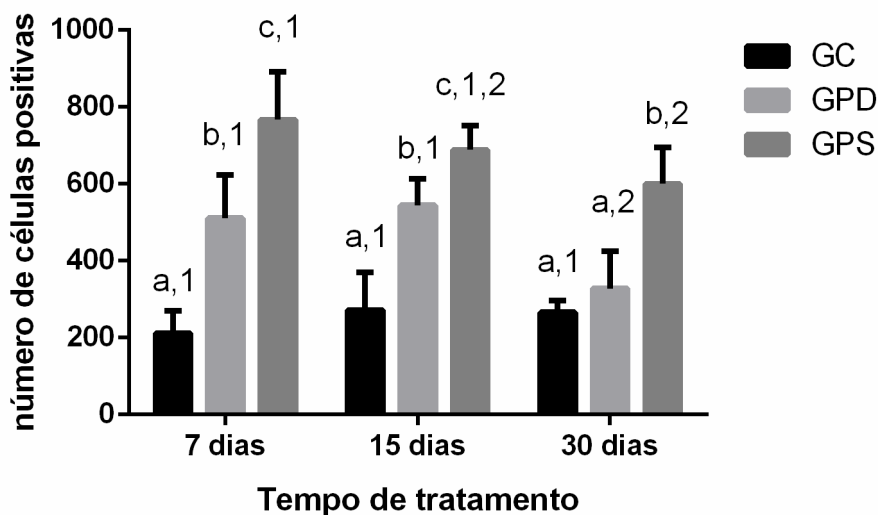


Gráfico representando o número de células MMP-8-imunopositivas/mm² (expressos os valores da média) na lâmina própria da mucosa gengival dos animais dos grupos GC, GPD e GPS, nos períodos de 7, 15 e 30 dias de tratamento.

A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras minúsculas sobre as barras dos gráficos; letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. A comparação entre períodos no mesmo grupo é indicada por números sobre as barras dos gráficos; números iguais indicam que diferenças significantes não foram detectadas (teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração da autora.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a diacereína ocasionou uma redução na imunexpressão de IL-1 β na lâmina própria da mucosa gengival de ratos com doença periodontal induzida. O tratamento com diacereína reduziu significativamente o processo inflamatório e a imunexpressão de MMP-8 na mucosa gengival, além de promover uma marcante redução no número de osteoclastos na superfície óssea de molares de ratos com periodontite. Assim, estes achados indicam que a diacereína reduz significativamente os efeitos deletérios da doença periodontal sobre os tecidos periodontais, favorecendo a sua reparação. Portanto, nossos resultados reforçam a ideia de que a IL-1 β tem um importante papel na cascata de eventos celulares e moleculares envolvidos na doença periodontal.

A periodontite induzida nos molares de ratos causou um aumento significativo de células inflamatórias, perda de inserção do epitélio juncional e marcante perda óssea, comprovando que a ligadura foi realizada com êxito e que constitui uma metodologia capaz de promover a doença periodontal^{24,69,70}. No grupo controle, embora uma baixa porcentagem de células inflamatórias estava presente na mucosa gengival dos molares, diferenças significantes não foram detectadas na frequência destas células com o decorrer do tempo. Sabe-se que a gengiva de indivíduos que apresentam condições clínicas de saúde periodontal exibe um infiltrado inflamatório residente, caracterizado pela presença de neutrófilos e macrófagos fixos, assim como elementos do sistema mononuclear fagocitário (sistema retículo-endotelial), os quais são derivados de monócitos do sangue. Embora escassos, os eosinófilos também estão presentes na lâmina própria, além de focos de linfócitos e plasmócitos os quais são observados principalmente na lâmina própria subjacente ao epitélio do sulco gengival⁷¹. Em ratos, a presença de infiltrado inflamatório discreto em mucosa gengival de molares sem doença periodontal tem sido reportado em outros estudos^{24,25,72}.

No presente estudo, uma acentuada imunomarcção para IL-1 β foi detectada na mucosa gengival de molares com doença periodontal, apontando para o envolvimento desta citocina na instalação da periodontite. Nossos resultados mostraram claramente um efeito da diacereína (inibidor de IL-1 β) na regressão do processo inflamatório, pois não foram observadas diferenças significantes na frequência de células inflamatórias entre os grupos GPD e GC, em todos os períodos de tratamento. Por outro lado, nos períodos de 7, 15 e 30 dias, a frequência de células inflamatórias nos animais do grupo GPS foi elevada em comparação aos grupos GPD e GC. Estes resultados mostram que, embora após a remoção da ligadura ocorra uma redução no infiltrado inflamatório na mucosa gengival, o tratamento com a diacereína promoveu uma

redução mais acentuada. Isso é confirmado pelo fato de que após 7 dias de tratamento, significantes diferenças não foram encontradas entre os animais do GPD e do GC enquanto no GPS, a incidência de células inflamatórias ainda permaneceu elevada após 30 dias. A IL-1, principalmente a IL-1 β , tem um papel de relevância tanto na inflamação aguda quanto crônica⁸. Células inflamatórias (como linfócitos Th17 e macrófagos) possuem o receptor para IL-1 (IL-1R); portanto, quando esta citocina pró-inflamatória se liga ao seu respectivo receptor, dá-se início a ativação destas células^{73,74}. Nas células endoteliais, a IL-1 β , após ligar-se ao seu receptor, é capaz de aumentar a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), estimulando a secreção de quimiocinas, dentre elas a IL-8 que estimula o recrutamento e a migração de neutrófilos até os sítios afetados. A IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória, também regula a síntese e a secreção de PGE₂ e óxido nítrico, promovendo um aumento no fluxo sanguíneo e no processo inflamatório^{8,9,75}. Além disso, esta interleucina tem um papel importante na diferenciação de células inflamatórias da resposta imune inata, as quais possuem receptor de IL-1 (IL-1R), bem como sobre a resposta imune adquirida⁷⁴.

Há evidências, a partir de estudos *in vitro*, de que a diacereína possui efeito inibitório sobre a síntese de IL-1^{62,63}. No presente estudo, a marcante redução da imunoexpressão de IL-1 β dos animais do GPD sugere que o tratamento com diacereína foi capaz de promover uma diminuição na síntese desta citocina na mucosa gengival dos animais com doença periodontal. Esta ideia é reforçada desde que na mucosa gengival dos animais do grupo GPS, o número de células positivas à IL-1 β foi significativamente superior aos animais do GPD, em todos os períodos. Além disso, diferenças significantes não foram observadas na imunoexpressão entre os grupos GPD e GC, aos 15 e 30 dias. Portanto, nossos resultados mostraram que a diacereína apresentou um efeito mais evidente a partir dos 15 dias de tratamento, sugerindo que o seu efeito pode ser tempo-dependente. Assim, é concebível sugerir que o tratamento com a diacereína promoveu uma redução na síntese de IL-1 β , explicando, pelo menos em parte, a menor frequência de células inflamatórias na mucosa gengival dos animais do grupo GPD.

Sabe-se que a IL-1, tanto IL-1 α quanto IL-1 β , tem uma série de atributos, dentre eles funções hematopoiéticas, inflamatórias, metabólicas, fisiológicas e imunológicas⁷⁶. Foi demonstrado *in vivo* que a inibição deste mediador e de TNF- α gera uma deficiência no recrutamento de células inflamatórias ao sítio afetado pela doença periodontal, evidenciando sua importância para este processo³⁹. Isto se deve ao fato de que ambos os mediadores estimulam a expressão de moléculas de adesão tecidual pelo endotélio, como ICAM-1 e VCAM-1 (proteína de adesão celular vascular-1)⁷⁷, favorecendo a diapedese e a adesão leucocitária⁷⁸. O ICAM-1 é uma glicoproteína de superfície celular que faz parte da constituição

da porção vascular do tecido endotelial, bem como de fibroblastos, células epiteliais e alguns leucócitos⁷⁹. Por ser uma proteína de membrana que possui um domínio extracelular contendo cinco regiões semelhantes à das imunoglobulinas, é classificada como membro da superfamília de imunoglobulinas⁸⁰. A expressão de ICAM-1 é regulada inicialmente de maneira transcricional, sendo submetida ao estímulo de citocinas como IL-1 β , TNF e também LPS bacteriano (lipopolissacarídeo)^{79,81,82}. Os baixos níveis constitutivos de ICAM-1 no endotélio são suprarregulados pelo estímulo de receptores endoteliais, incluindo receptores para citocinas (como o receptor-1 para TNF) e do tipo *Toll-like*⁸³. O ICAM-1 é capaz de se ligar ao antígeno integrina-b2 associado à função de linfócitos (*b2-integrin lymphocyte function-associated antigen*) pelo seu primeiro domínio de imunoglobulina, enquanto que o antígeno de macrófago-1 se liga ao terceiro domínio de imunoglobulina do ICAM-1⁸⁴⁻⁸⁶. Após sua adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (realizando a diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação guiados pelos fatores quimiotáticos⁸⁷. Dentre os fatores quimiotáticos, destaca-se a IL-8, quimiocina capaz de recrutar células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares. A IL-1 é capaz de interagir com o endotélio, ativando de maneira transcricional o gene de IL-8 nestas células¹⁰. Assim, é possível que a inibição da IL-1 β , causada pela diacereína, tenha interferido no recrutamento e na transmigração dos leucócitos para a lâmina própria da mucosa gengival e, promovendo a regressão do processo inflamatório.

Nossos resultados também apontam para um efeito inibidor da diacereína sobre o processo reabsortivo, desde que o número de osteoclastos no GPD foi significativamente menor nos animais do GPS, aos 7 e 15 dias. Além disso, no GPD o número de osteoclastos não diferiu significativamente em relação ao GC, em todos os períodos. Em contraposição, nos animais do GPS, em todos os períodos, o número de osteoclastos foi significativamente maior em comparação ao GC. Foi demonstrado que a formação de osteoclastos pode ser induzida por citocinas como TNF- α , IL-6 (quando ligada a seu receptor solúvel sIL-6R) e IL-1. Há evidências de que a IL-1, associada a níveis mínimos de RANKL, é capaz de induzir osteoclastogênese a partir de células precursoras^{29,88}. A IL-1 regula a expressão de RANKL em células do estroma^{88,89} e estimula citocinas, entre elas o TNF- α e a IL-6 que exercem papel na ativação de NF- κ B, fator importante para a osteoclastogênese, e induzem a fusão e diferenciação de osteoclastos^{90,91}.

Portanto, o reduzido número de osteoclastos observado nos animais tratados com diacereína em comparação aos ratos do GPS pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo efeito inibidor da diacereína sobre a IL-1 β , citocina que atua sobre o fator NF- κ B, o qual estimula a osteoclastogênese. Monócitos e macrófagos ativados produzem o que antes era

denominado “fator de ativação de osteoclasto”, fator este mais tarde reconhecido como IL-1 β ^{92,93}. O NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B) envolve uma família de cinco proteínas: p50, p52, p65, RelA e c-Rel, capazes de regular a expressão de uma diversidade de genes relacionados com a resposta imunológica, atividades celulares, além controlar o tempo de sobrevivência da célula⁹⁴. Sabe-se que a expressão das proteínas p50 e p52 são essenciais em precursores de osteoclastos para osteoclastogênese, porém dispensável no que diz respeito à sobrevivência da célula multinucleada⁹⁵. No entanto, a redução significativa no número de osteoclastos nos molares dos animais do GPD não foi capaz de reduzir a perda óssea do processo alveolar interproximal, posto que significantes diferenças na altura deste processo não foram detectadas entre os animais do GPD e GPS. De fato, após a remoção da ligadura, a perda óssea interproximal foi aparentemente “interrompida”, independentemente do tratamento.

A MMP-8, uma metaloproteinase da matriz associada a degradação do colágeno tipo I, II e III¹⁴, foi detectada na mucosa gengival de ratos com periodonto saudável. No entanto, nossos resultados mostraram um aumento na imunoexpressão desta MMP na lâmina própria da mucosa gengival de molares com doença periodontal. A MMP-8 foi observada em neutrófilos e macrófagos, além de fibroblastos na lâmina própria da gengiva, como tem sido reportado por outros autores⁹⁶⁻⁹⁸. A MMP-8 está presente na mucosa gengival de periodonto saudável (sem doença periodontal), pois esta MMP desempenha um papel na remodelação dos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo, participando, portanto, na homeostase dos tecidos⁹⁹. A maior parte das MMPs, dentre elas a MMP-8, são enzimas secretadas em sua forma inativa, ou seja, como uma pró-MMP. A ativação da MMP-8 depende de várias citocinas, dentre as quais outras MMPs, como a MMP-10¹⁰⁰ e a IL-1³⁴. O aumento desta MMP tem sido associado à degradação do tecido conjuntivo gengival durante a doença periodontal^{101,102}, degradação do colágeno em periodonto submetido à tração ortodôntica¹⁰³ e a progressão de doenças reumáticas¹⁰⁴. Assim, a MMP-8 tem um importante papel na instalação e progressão de diferentes doenças, dentre elas a doença periodontal. Nossos resultados demonstraram que a mucosa gengival de ratos, após 7 dias de indução da DP, exibiu um aumento de, aproximadamente, 4 vezes na imunoexpressão de MMP-8. De fato, a MMP-8 (ou collagenase-2) tem sido considerada como um dos principais biomarcadores da degradação do tecido conjuntivo característico da periodontite¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. É importante ressaltar que o aumento da MMP-8 foi paralelo ao aumento da imunoexpressão de IL-1 β na mucosa gengival dos ratos com doença periodontal.

Os animais tratados com diacereína apresentaram um menor número de células imunopositivas para MMP-8 em comparação ao GPS que pode ser explicado, pelo menos em

parte, devido à baixa incidência de células inflamatórias na mucosa gengival destes animais. Além disso, é possível que a redução de IL-1 β causada pela diacereína possa ter promovido uma redução na síntese desta MMP pelas células da lâmina própria da gengiva. No entanto, futuros estudos devem ser realizados para investigar esta possibilidade.

Nossos resultados apontam para um efeito benéfico da diacereína nas alterações estruturais dos tecidos periodontais após a remoção da ligadura em molares de ratos. A diacereína foi capaz de promover uma redução marcante na interleucina-1 β na mucosa gengival de molares de ratos com doença periodontal induzida. Considerando que a IL-1 é uma das citocinas envolvidas no recrutamento e migração de leucócitos a partir dos vasos sanguíneos, a redução significativa de IL-1 β deve ser responsável pela supressão rápida do processo inflamatório observada na mucosa gengival dos animais do GPD. Além disso, a redução significativa de osteoclastos na superfície óssea dos animais do GPD indica uma interferência da diacereína, seja na formação ou na sobrevivência destas células multinucleadas. A redução da IL-1 β , induzida pela diacereína, deve também ser responsável pela baixa imunoexpressão de MMP-8 na mucosa gengival.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados acima descritos, pode-se concluir, portanto, que a diacereína deve reduzir a síntese e liberação de IL-1 β e MMP-8 na periodontite e, conseqüentemente, diminuir o infiltrado inflamatório e o número de osteoclastos, restringindo assim a destruição característica da doença periodontal. Futuros estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no uso deste inibidor de IL-1 β e comprovar sua ação terapêutica na doença periodontal.

REFERÊNCIAS*

1. Doyle AC. Um estudo em vermelho: uma Aventura de Sherlock Holmes. 1. ed. São Paulo: Martin Claret; 2009. p. 24.
2. Papapanou PN, Lindhe J. Epidemiologia das doenças periodontais. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Trad. Kuchenbecker Rosing C. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. p. 123-72.
3. Boukourt KN, Saidi-Ouahrani N, Boukerzaza B, Ouhaibi-Djellouli H, Hachmaoui K, Benaissa FZ, et al. Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population. Arch Oral Biol. 2015; 60(10): 1463-70.
4. Lopes D, Jabr C, Dejani N, Saraiva A, de Aquino S, Medeiros A, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase attenuates inflammation and bone resorption in lipopolysaccharide-induced periodontal disease. J Periodontol. 2017; doi: 10.1902/jop.2017.170210. Epub 2017 Dec 5.
5. Huang R, Lu S, Su K, Chen J, Fang W, Liao W, et al. Diacerein: a potential therapeutic drug for periodontal disease. Med Hypotheses. 2012; 79(2): 165-7.
6. Cardoso EM, Reis C, Manzanares-Céspedes MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. Postgrad Med. 2018; 130(1): 98-104.
7. López NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. J Periodontol. 2005; 76(2): 234-43.
8. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. Periodontol 2000. 2004; 35: 42-52.
9. Moeintaghavi A, Arab HR, Rahim Rezaee SA, Naderi H, Shiezadeh F, Sadeghi S, et al. The effects of smoking on expression of IL-12 and IL-1 β in gingival tissues of patients with chronic periodontitis. Open Dent J. 2017; 11: 595-602.
10. Sica A, Matsushima K, Van Damme J, Wang JM, Polentarutti N, Dejana E, et al. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. Immunology. 1990; 69(4): 548-53.
11. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(17): 7119-24.
12. Shibata KI. Historical aspects of studies on roles of the inflammasome in the pathogenesis of periodontal diseases. Mol Oral Microbiol. 2018; 33(3): 203-11.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Woessner JF Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 732: 11-21.
14. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827–39.
15. Mäntylä P, Stenman M, Kinane D, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, et al. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J Periodontal Res.* 2006; 41(6): 503-12.
16. Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol.* 2010; 81(11): 1644-52.
17. Diacereína [bula]. São Paulo: TRB Pharma. 2015.
18. Zaki BM, Mahmoud EA, Aly AA. Diacerein: a potential therapeutic drug for the management of experimental periodontitis in rats. *Electron Physician.* 2015; 7(5): 1290-5.
19. Pavelka K, Bruyère O, Cooper C, Kanis JA, Leeb BF, Maheu E, et al. Diacerein: benefits, risks and place in the management of osteoarthritis. An opinion-based report from the ESCEO. *Drugs Aging.* 2016; 33(2): 75-85.
20. Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM. Possible protective effect of diacerein on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Toxicol.* 2016; 2016: 9507563.
21. Chueakula N, Jaikumkao K, Arjinajarn P, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakom N, et al. Diacerein alleviates kidney injury attenuating inflammation and oxidative stress in obese insulin-resistant rats. *Free Radic Biol Med.* 2017; 115: 146-55.
22. Filardo G, Kon E, Longo UG, Madry H, Marchettini P, Marmotti A, et al. Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016; 24(6): 1775-85.
23. Tamura T, Shirai T, Kosaka N, Ohmori K, Takafumi N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur J Pharmacol.* 2002; 448(1): 81-7.
24. Longhini R, Aparecida de Oliveira P, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol.* 2014; 85(8): 1115-25.
25. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces Interleukin-6, Matrix Metalloproteinases-1 And -9 Immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2017; 88(1): 100-11.

26. Hinrichs JE, Kotsakis G. Classificação das doenças e condições que afetam o periodonto. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontia clínica*. Trad Ferreira Robaina T. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p. 44-66.
27. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*. 2011; 38(11): 60-84.
28. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, et al. Inflammasome activation and IL-1 β target IL-1 α for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(44): 18055-60.
29. Feng W, Guo J, Li M. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *J Oral Biosci*. 2019; 61(1): 16-21.
30. Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular, leukotriene B (fluid levels of interleukin-14), prostaglandin E2, thromboxane B2 in experimental and tumour necrosis factor gingivitis in humans. *J Periodontal Res*. 1993; 28(4): 241-7.
31. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(11): 885-90.
32. Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, et al. Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res*. 1991; 6 (2): 183-9.
33. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*. 1999; 247(1): 84-93.
34. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74(3): 391-401.
35. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991; 26(3): 230-42.
36. Preshaw PM. *Patogênese Periodontal*. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontia clínica*. Trad. Queiroz Faria LC. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p. 68-92.
37. Strålberg F, Kassem A, Kasprzykowski F, Abrahamson M, Grubb A, Lindholm C, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo by cysteine proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol*. 2017; 101(5): 1233-43.
38. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*. 1991; 62(8): 504-9.
39. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998; 160(1): 403-9.

40. Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Kato A, Mezawa M, Takai H, et al. Tumor necrosis factor- α regulates human follicular dendritic cell-secreted protein gene transcription in gingival epithelial cells. *Genes Cells*. 2018; 23(3): 161-71
41. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Patogênese da periodontite. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Trad Vieira Falabella ME. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. p. 271-91.
42. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993; 64(5): 474-84.
43. Ryan ME, Ramamurthy NS, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol*. 1996; 3: 85-96.
44. 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-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem*. 1990; 265(28): 17238-45.
45. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(Suppl 11): 44-8.
46. Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 2000; 79(12): 1969-77.
47. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(2): 100-9.
48. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000*. 1993; 3: 39-63.
49. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*. 2003; 38(4): 400-4.
50. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Rocha FR, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J Anat*. 2012; 220(1): 77-85.
51. Sato T, Ovejero MD, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, et al. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci*. 1997; 110(5): 589-96.
52. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65(1): 1-13.

53. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006; 40: 11–28.
54. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003; 38(4): 380-7.
55. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 421746. doi: 10.1155/2015/421746.
56. Costa LC, Fonseca MAD, Pinheiro ADR, Aguiar TRDS, Machado NA, Quinelato V, et al. Chronic periodontitis and RANKL/OPG ratio in peri-implant mucosae inflammation. *Braz Dent J*. 2018; 29(1): 14-22.
57. Shimamura M, Nakagami H, Osako MK, Kurinami H, Koriyama H, Zhengda P, et al. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(22): 8191-6.
58. Strålberg F, Henning P, Gjertsson I, Kindlund B, Souza P, Persson E, et al. Cysteine proteinase inhibitors regulate human and mouse osteoclastogenesis by interfering with RANK signaling. *FASEB J*. 2013; 27(7): 2687-701.
59. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(5): 370–376.
60. Wally V, Kitzmueller S, Lagler F, Moder A, Hitzl W, Wolkersdorfer M, et al. Topical diacerein for epidermolysis bullosa: a randomized controlled pilot study. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8: 69.
61. da Silva M, Cidral-Filho F, Winkelmann-Duarte E, Cargnin-Ferreira E, Calixto J, Dutra R, et al. Diacerein reduces joint damage, pain behavior and inhibits transient receptor potential vanilloid 1, matrix metalloproteinase and glial cells in rat spinal cord. *Int J Rheum Dis*. 2017; 20(10): 1337-49.
62. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J Rheumatol*. 1998; 25(4): 753-62.
63. Yaron M, Shirazi I, Yaron I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999; 7(3): 272-80.
64. Tamura T, Kosaka N, Ishiwa J, Sato T, Nagase H, Ito A. Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and upregulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage*. 2001; 9(3): 257-63.
65. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 1982; 34(1): 285-90.

66. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res.* 2007; 42(3): 193-201.
67. Crusodé-de-Souza M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. *J Anat.* 2009; 215(6): 673-81. Erratum in: *J Anat.* 2010; 216(3): 420. Crusodé-Souza, Mady [corrected to Crusodé de Souza, Mady].
68. Longhini R, de Oliveira PA, de Souza Faloni AP, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J Anat.* 2013; 222(2): 239-47.
69. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018; 81(12): 1412-21.
70. Tsurumaki JDN, Paula LGF, Aquino SG, Marcantonio EJr, Oliveira GJPL, Marcantonio RAC. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on periodontal repair in rats with arthritis and induced periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2019; 27: e20180602.
71. Fiorellini JP, Kim DM, Uzel NG. Anatomia do periodonto. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontia clínica.* Trad. Ferreira Robaina T. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p. 44-66.
72. Santamaria-Jr M, Bagne L, Zaniboni E, Santamaria MP, Jardini MAN, Felonato M, et al. Diabetes mellitus and periodontitis: Inflammatory response in orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2020; 23(1): 27-34.
73. Deng J, Yu XQ, Wang PH. Inflammasome activation and Th17 responses. *Mol Immunol.* 2019; 107: 142-64.
74. Dutta P, Sultana S, Dey R, Bishayi B. Regulation of *Staphylococcus aureus*-induced CXCR1 expression via inhibition of receptor mobilization and receptor shedding during dual receptor (TNFR1 and IL-1R) neutralization. *Immunol Res.* 2019; 67(2-3): 241-60.
75. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018; 281(1): 8-27.
76. Dower SK, Sims JE, Cerretti DP, Bird TA. The interleukin-1 system: receptors, ligands and signals. *Chem. Immunol.* 1992; 51: 33-64.
77. Gimbrone MA Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 598: 77-85.
78. Bevilacqua MP, Nelson RM. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemostasis.* 1993; 70(1): 152-4.

79. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon-gamma: Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *Immunol.* 1986; 137(1): 245-54.
80. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell.* 1988; 52(6): 925-33.
81. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(6): 876-88.
82. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(9): 1379-86.
83. Xiao L, Liu Y, Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 306(3): H317–25.
84. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; 339(6219): 61–4.
85. Li R, Nortamo P, Valmu L, Tolvanen M, Huuskonen J, Kantor C, et al. A peptide from ICAM-2 binds to the leukocyte integrin CD11a/CD18 and inhibits endothelial cell adhesion. *J Biol Chem* 1993; 268(23): 17513–8.
86. Xie J, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, et al. Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol* 1995; 155(7): 3619–28.
87. Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010; 25(4): 575-84.
88. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115(2): 282-90.
89. Que BG, Wise GE. Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev Dyn [Internet].* 1998; 212(3): 346–51.
90. Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology.* 1995; 193(2-4): 193-203.
91. Kondo A, Otsuka T, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Wada I, et al. Inhibition of SAPK/JNK leads to enhanced IL-1-induced IL-6 synthesis in osteoblasts. *Arch Biochem Biophys.* 2013; 535(2): 227-33.
92. Gowen M, Wood DD, Ihrie, EJ, McGuire MKB, Russell RGG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature.* 1983; 306(5941): 378–80.
93. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: Identity with interleukin 1b. *J. Immunol.* 1985; 135(4): 2562–8.

94. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004; 18(18): 2195-224.
95. Xing L, Bushnell TP, Carlson L, Tai Z, Tondravi M, Siebenlist U, et al. NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK-expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK- and cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(7): 1200-10
96. Naesse EP, Schreurs O, Helgeland K, Schenck K, Steinsvoll S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Periodontal Res.* 2003; 38(6): 575-82.
97. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(3): 224-32. Erratum in: *J Clin Periodontol.* 2004; 31(2): 149. Chen, HW [corrected to Chen, HY].
98. Sorsa T, Hernández M, Leppilahti J, Munjal S, Netuschil L, Mäntylä P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis.* 2010; 16(1): 39-45.
99. Balbín M, Fueyo A, Knäuper V, Pendás AM, López JM, Jiménez MG, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem.* 1998; 273(37): 23959–68.
100. Knäuper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur J Biochem.* 1996; 235(1-2): 187-91.
101. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* 2010; 81(3): 384-91.
102. Javed F, Ahmed HB, Saeed A, Mehmood A, Bain C. Whole salivary interleukin-6 and matrix metalloproteinase-8 levels in patients with chronic periodontitis with and without prediabetes. *J Periodontol.* 2014; 85(5): e130-5.
103. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae J-W, Mitani H, Okazaki M, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 Genes in the Periodontal Ligament during Tooth Movement in Rats. *J Dent Res [Internet].* 2003; 82(8): 646–51
104. Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Lab Invest [Internet].* 1996; 74(1): 232–40.
105. Sorsa T, Tjäderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006; 38(5): 306–21.

106. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10(6): 311–18
107. Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res.* 1988; 23(6): 386–93.

ANEXO A – Certificado de aprovação pela CEUA



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"EFEITO DA DIACEREÍNA NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM MOLARES DE RATOS"***, registrada com o nº 17/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 28/08/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzman
Nº de animais	66
Peso/Idade	220g – adultos jovens
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

25 set em 2018

Carina A. F. Andrade

Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 27 de março de 2020.

Renata Cristina Lima Silva