



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA (PPGO) - MESTRADO

JORDANA HEIDEMANN PANDINI

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos
submetidos à periodontite experimental

Cascavel-PR
2019

JORDANA HEIDEMANN PANDINI

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos
submetidos à periodontite experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar

Cascavel-PR
2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Heidemann Pandini, Jordana

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos submetidos à periodontite experimental / Jordana Heidemann Pandini; orientador(a), Carlos Augusto Nassar , 2019.

31 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2019.

1. Resveratrol. 2. Doença periodontal. 3. Inflamação. I. Nassar , Carlos Augusto. II. Título.



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel - CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4888 - Cascavel - Paraná



JORDANA HEIDEMANN PANDINI

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos submetidos à periodontite experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Carlos Augusto Nassar

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Christian Giampietro Brandão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Danielle Shima Luize Sotovia

Cascavel, 22 de março de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha maior mestra **Maria Heidemann Rocha**, que mesmo em um plano espiritual diferente do meu, me ajudou no desenvolvimento e conclusão do mesmo. Uma mulher, mãe, avó e professora admirável. Todo meu amor por ela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me deu inúmeras oportunidades e sabedoria para aproveitá-las.

Aos meus pais e meu irmão que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao Marcelo Maeda por toda a compreensão e paciência nos momentos difíceis e por sempre dividir e compartilhar as alegrias nos bons momentos.

Ao meu querido orientador Carlos Nassar, que vem acompanhando minha trajetória desde a graduação, contribuindo com meu crescimento e aprendizado. Obrigada pela dedicação e por ter aceito o convite de mais uma vez ser meu orientador.

Aos queridos mestres Christian Gianpietro Brandão e Danielle Shima Luize que contribuíram muito com o desenvolvimento deste trabalho e sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Aos colegas Pedro, Lais, João e Matheus que estiveram de prontidão para me ajudar e foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À cada pessoa querida da Unioeste que me acolheu, em especial, a Flavia Freytag que veio de presente e me ajudou sem hesitar todas as vezes que precisei.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos submetidos à periodontite experimental

RESUMO

O resveratrol é um polifenol bem conhecido por seus benefícios à saúde: pode prevenir a obesidade, melhorar o controle metabólico do diabetes, prevenir e tratar a artrite reumatóide e exercer atividade anticancerígena, além de proteger contra a degeneração neural e prevenir doenças cardiovasculares. Também foi demonstrado que o resveratrol pode interferir positivamente com osteoblastogênese, contribuindo para a nova formação óssea, podendo promover efeitos imunomoduladores na resposta do hospedeiro na presença de doença periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar o aspecto dos tecidos periodontais, sob administração do resveratrol através de exames histológicos, morfológicos e radiográficos de ratos com periodontite induzida experimentalmente. Para a realização deste estudo, foram utilizados 24 ratos machos *Wistar*, com 75 dias de idade, sendo que metade do número total de animais recebeu uma ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo que atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e o consequente desenvolvimento da doença periodontal, formando os grupos com periodontite experimental. Após este procedimento foram originados 4 grupos: 1) Grupo Controle (CON); 2) Grupo Ligadura (LIG); 3) Grupo Resveratrol (RSV); 4) Grupo Ligadura-Resveratrol (LIG-RSV). Os animais pertencentes aos grupos Resveratrol receberam uma dose diária de 10 mg/kg de peso corporal do polifenol, via oral, durante 4 semanas. Após 105 dias de período experimental, foi realizada a eutanásia, onde foram coletadas amostras de tecido gengival para realização de análise imunológica, bem como houve a dissecação das hemimandíbulas, que foram submetidas à análise histológica, morfológica e radiográfica, para avaliação dos tecidos periodontais. Os resultados demonstraram uma perda óssea alveolar significativamente menor ($p < 0,05$) nos animais que receberam a administração de resveratrol, evidenciado tanto radiograficamente, histomorfometricamente e histologicamente na contagem de células ósseas. Além disso, o resveratrol foi capaz de reduzir a concentração da interleucina 17 (IL-17) nos grupos que receberam sua administração, associado ou não a doença periodontal induzida, porém, não demonstrou nenhum efeito protetor sobre os tecidos gengivais dos animais. Assim, pode-se concluir, com estes resultados, que a administração do resveratrol poderia provocar um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar de ratos com periodontite experimental, além de atuar positivamente sobre a IL-17. Entretanto, não apresentou efeito sobre os tecidos gengivais nos grupos com a presença da doença periodontal.

Palavras-chave: Doença periodontal, polifenol, vinho.

Evaluation of the resveratrol effect on the periodontal tissues of rats submitted to experimental periodontitis

ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenol well known for its health benefits: can prevent obesity, improve metabolic control of diabetes, prevent and treat rheumatoid arthritis, exercise anticancer activity, besides protect against neural degeneration and prevent cardiovascular disease. It has also been shown that resveratrol can positively interfere with osteoblastogenesis, contributing to a new bone formation, possibly promoting immunomodulator effect on host response in presence of periodontal disease. The aim of this study was to evaluate the appearance of periodontal tissues under resveratrol administration by means of histological, morphological and radiographic examinations of experimentally induced periodontitis rats. For the accomplishment of this study, 24 male Wistar rats, with 75 days of age were used, from which half of the total amount of animals receiving a ligature around the first inferior right and left molars, that acted as a gingival irritant for 30 days, favoring the accumulation of plaque and, consequently, the development of periodontal disease, forming the groups with experimental periodontitis. After this procedure, 4 groups were generated: 1) Control Group (CON); 2) Ligature Group (LIG); 3) Resveratrol Group (RSV); 4) Ligature-Resveratrol Group (LIG-RSV). Animals belonging to the Resveratrol groups received a daily dose of 10 mg/kg body weight of the polyphenol, orally, for 4 weeks. After 105 days of the experimental period, euthanasia was carried out, where gingival tissue samples were collected for immunological analysis, as well as hemimandibula dissection, which were submitted to histological, morphological and radiographic analysis to evaluate the periodontal tissues. The results showed a significantly lower alveolar bone loss ($p < 0.05$) in the animals receiving Resveratrol, evidenced both radiographically, histomorphometrically and histologically in the bone cell count. In addition, resveratrol was able to reduce the concentration of interleukin-17 (IL-17) in the groups that receive it, associated or not with periodontal disease induced, but showed no protective effect on the gingival tissues of the animals. Thus, it can be concluded from these results, that the administration of resveratrol could provoke a protective effect on the alveolar bone loss of rats with experimental periodontitis, in addition to action positively on IL-17. However, it had no effect on the gingival tissues of the groups in presence of periodontal tissues.

Keywords: Periodontal disease, polyphenol, wine.

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas:
InflammationResearch. Disponível em:
[https://www.springer.com/biomed/immunolog
y/journal/11](https://www.springer.com/biomed/immunology/journal/11)

SUMÁRIO

1 Introdução.....	9
2 Metodologia.....	12
3 Resultados.....	17
4 Discussão.....	22
5 Conclusão	26
6 Referências bibliográficas	27
7. Anexos.....	31
7.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	31

Introdução

A doença periodontal (DP) é uma das doenças orais mais importantes no mundo, e a má higiene oral continua sendo a sua maior causa. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a forma grave dessa doença afeta aproximadamente 10 a 20% das pessoas e as formas leve e moderada de 20 a 50% em todo o mundo, correspondendo a 15% dos adultos entre 21 e 50 anos de idade. No Brasil, a prevalência da forma moderada da doença em adultos foi de 15,3% e a forma grave foi de 5,8%. Além disso, os indivíduos de baixa escolaridade e de classes sociais mais baixas são os mais afetados (OLIVEIRA, WATT e HAMER, 2010; TOREGANI *et al.*, 2014; VETTORE, MARQUES e PERES, 2013). A doença periodontal não é mais identificada apenas como um problema de saúde oral, mas também uma questão de saúde pública, uma vez que está associada à saúde sistêmica (SURESH, MAHENDRA, 2014).

A periodontite é uma doença infecciosa crônica causada predominantemente por bactérias (SANTOS *et al.*, 2014), sendo uma forma inflamatória mais avançada da doença periodontal, na qual ocorre a desagregação dos tecidos de suporte dos dentes cuja progressão pode levar à mobilidade e, finalmente, à perda dos dentes (NASCIMENTO, 2013).

Na fisiopatologia da DP, as bactérias produzem lipopolissacarídeos (LPS) capazes de desencadear a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, bem como nas respostas sistêmicas ao processo inflamatório oral, dentre elas a interleucina (IL) 1 β , a qual estimula a produção de prostaglandina E2 (PGE2); IL 6, que estimula a produção de imunoglobulinas e reabsorção óssea, sendo sua secreção acentuada na inflamação periodontal; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que é produzido por monócitos e macrófagos e ativa osteoclastos responsáveis pela reabsorção de osso, cemento e ligamento periodontal, atuando sinergicamente com IL 1 e IL 6, e a Proteína C-Reativa (PCR), a qual serve como um marcador para a inflamação sistêmica. A IL-17, descrita mais recentemente, também está diretamente relacionada à progressão da doença e consequente degradação tecidual na periodontite. (GARLET *et al.*, 2012; LINS *et al.*, 2007; SCHENKEIN e LOOS, 2013; BASTOS *et al.*, 2005; RODRIGES *et al.*, 2009).

Após o estímulo inflamatório, ocorre um aumento da produção de PGE2 e da matriz de metaloproteinases (MMP), acarretando na destruição das estruturas de sustentação dos dentes, estimulando a reabsorção do osso alveolar. Além disso, com a evolução da doença e produção dessas citocinas pró-inflamatórias, ocorrerá a formação de bolsas periodontais, aumentando as concentrações de PCR e fibrinogênio, gerando uma resposta sistêmica.

Ocorre, também, o aumento das MMPs, em especial a MMP-8, única proteinase que tem a capacidade de fragmentar os colágenos tipo I e III, os quais são de suma importância para a manutenção estrutural do periodonto, intimamente ligada à progressão da doença e ao seu pior prognóstico (KALAKONDA *et al.*, 2016; POLEPALLE *et al.*, 2015; SCHENKEIN; LOOS, 2013; TOREGANI *et al.*, 2014).

Considerando o cenário complexo conduzido por numerosos mediadores pró e anti-inflamatórios com propriedades diferentes, tem-se investigado estratégias para modular a resposta imune-inflamatória do hospedeiro à doença periodontal. O estudo de Casati *et al.* (2013) relataram que tanto os anti-inflamatórios não esteroidais convencionais (AINEs) como os inibidores seletivos da ciclooxygenase-2 (COX-2) podem modular a reação imuno-inflamatória de um hospedeiro. Entretanto, o uso sistêmico desses fármacos está frequentemente relacionado a efeitos colaterais graves (FRITZGERALD e PATRONO, 2001).

Diversas plantas ou seus componentes ativos utilizados na medicina tradicional podem ser úteis para o tratamento de condições inflamatórias, sendo mais recente o crescente interesse sobre o resveratrol, através de estudos que focaram o seu uso para modular doenças imuno-inflamatórias, como a periodontite (CASATI *et al.*, 2013; CIRANO *et al.*, 2016).

O composto resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) é um polifenol presente em diversas espécies de plantas utilizadas para consumo humano e que pode ser encontrado principalmente em uvas, no vinho tinto e nozes (FRÉMONT *et al.*, 2000; SAIKO *et al.*, 2008; WENZEL e SOMOZA, 2005). Seu potente efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório, vêm mostrando benefício na prevenção e tratamento de algumas doenças como câncer, diabetes, distúrbios cardiovasculares, doenças degenerativas, autoimunes e metabólicas (BAUR *et al.*, 2006; SCHMATZ *et al.*, 2009; EL-MOWAFY *et al.*, 2011).

Demonstrou-se também que o resveratrol pode interferir positivamente na osteogênese, contribuindo para a neoformação óssea (TSENG *et al.*, 2011). No entanto, investiga-se se o resveratrol pode promover efeitos imunomoduladores na resposta do hospedeiro na presença de doença periodontal. Evidências têm apoiado cada vez mais teorias de que a resposta imuno-inflamatória influencia a composição do biofilme e que o controle da inflamação pode inibir o surgimento de um biofilme patogênico, além de melhorar a cicatrização periodontal. Assim, novos dados sobre a ação imuno-inflamatória do resveratrol podem sugeri-lo como uma nova terapêutica para pacientes com periodontite (TONETTI e CHAPPLE, 2011; CASATI *et al.*, 2013).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos submetidos ou não a doença periodontal induzida por ligadura.

Metodologia

Ao total, foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos (peso corporal entre 180-350 g) os quais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo do CCBS em ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas as 07:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e temperatura controlados, sendo separados em caixas individuais em grupos de 3-5 por caixa (41 cm de comprimento, 34 cm de largura e 17 cm altura). Os animais receberam dieta padrão e água a vontade por todo o período experimental. Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Grupos experimentais

Todo o cálculo amostral do estudo foi baseado no uso do Teste ANOVA para cálculo do tamanho das amostras, com poder de 90% e nível de significância de 5%, bem como baseado em estudos preliminares (CASATI *et al.*, 2013; CIRANO *et al.*, 2016).

Os 24 animais foram aleatoriamente divididos, sendo que a metade da amostra foi submetida à indução da periodontite por ligadura. Em seguida, os animais foram subdivididos, sendo que 6 animais dos grupos com ligadura e 6 animais sem ligadura, passaram ter administração de resveratrol. Todos os animais permaneceram com dieta padrão (Figura 1).

Indução da doença periodontal

Aos 75 dias de vida, metade do número total de animais foram anestesiados com xilazina 0,04mL/100g e quetamina 0,08mL/100g, e posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, um fio de algodão número 40 foi colocado ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo dos animais. A ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença periodontal (NASSAR *et al.*, 2009).

Administração do resveratrol

Os animais pertencentes aos grupos RSV e LIG-RSV passaram a receber o resveratrol, logo no dia seguinte após a colocação da ligadura. O polifenol em pó foi diluído em água em uma dose de 10 mg/kg de peso corporal e foi administrado diariamente, via oral por meio de gavagem durante 4 semanas (CASATI *et al.* 2013; CORRÊA *et al.*, 2018).

Eutanásia

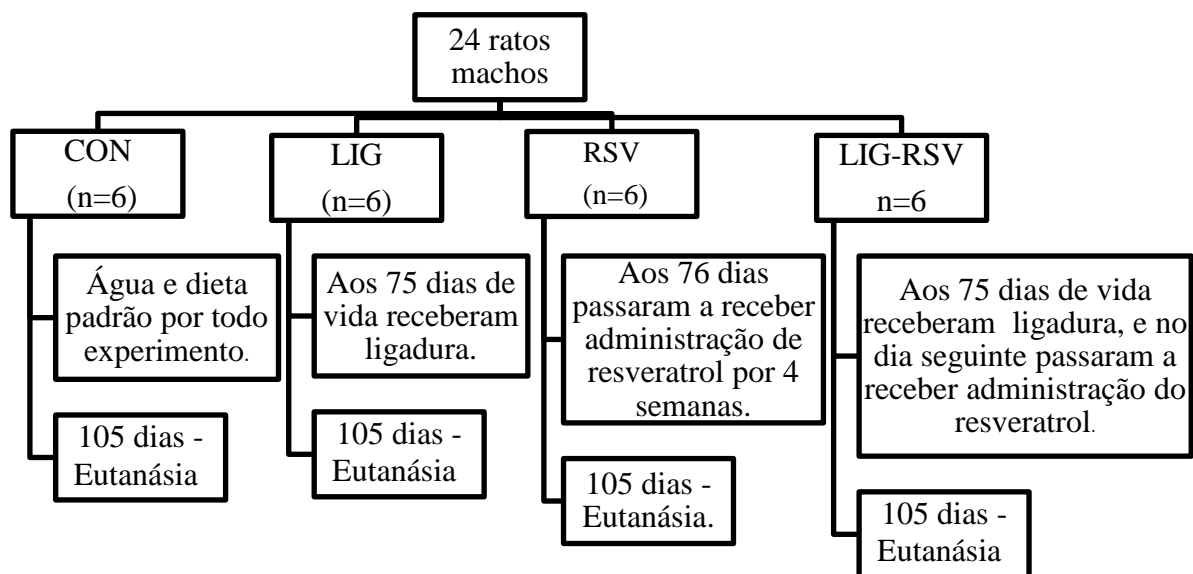


Figura 1: Figura esquemática representando a divisão dos grupos e protocolos experimentais realizados.

Análise radiográfica

Logo após a eutanásia, a hemimandíbula do lado esquerdo de cada animal foi retirada e fixada em formol tamponado com pH 7,2, durante 24 horas. Posteriormente, as hemimandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o sensor radiográfico digital Kodak RVG 6100, com resolução de imagem 20 pl/mm, resolução teórica do sensor 27,03 pl/mm, fibra ótica 1, dimensões de superfície ativa de 22 x 30 mm e dimensões da matriz (pixels) 1200 x 1600 (1,92 milhões). As mandíbulas foram posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. O aparelho de raios X (AGFA) foi regulado para 100mA, 0,05s, 40KV e uma distância foco/filme de um metro, com incidência de raios X perpendicular às peças. Nas imagens digitalizadas, foram realizadas 3 medidas no programa Image Tools 3.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX,

USA), através de uma medida linear, que percorreu a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo, sendo que essas medidas foram realizadas uma vez ao dia em 3 dias diferentes e retirada a média entre elas. As mesmas foram expressas em centímetros (NASSAR *et al.*, 2009).

Processamento histológico

As hemimandíbulas do lado direito obtidas foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas e descalcificadas com ácido tricloroacético (TCA) 5%, 10°C, por trinta dias. As peças foram avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com renovação da solução de TCA a cada cinco dias. Após a descalcificação, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% durante aproximadamente duas horas para neutralizar o TCA, lavados em água corrente por duas horas, mantidos em álcool 70% até o processamento histológico para inclusão em parafina (PurifiedParaffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). Os fragmentos das hemimandíbulas foram desidratados em série alcoólica ascendente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo manual (Olympus, CUT 4055 - Charleston, Carolina do Sul, EUA) para obtenção de secções de 7µm de espessura, que foram montadas em lâminas histológicas e coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE).

Análises histológicas

A análise microscópica foi realizada por um único examinador treinado através da avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland) para observações morfológicas do tecido gengival, processo alveolar e contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos das hemimandíbulas dos animais.

Morfometria gengival

As medidas morfométricas foram feitas nas gengivas marginais vestibular e lingual direita em todos os grupos, utilizando-se um programa analisador de imagens (Image Tool

3.0), acoplado a um microscópio de luz com objetiva de 10x, a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento dos cortes (cerca de 50 μm).

As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, (Figura 2). Os resultados foram expressos em μm .

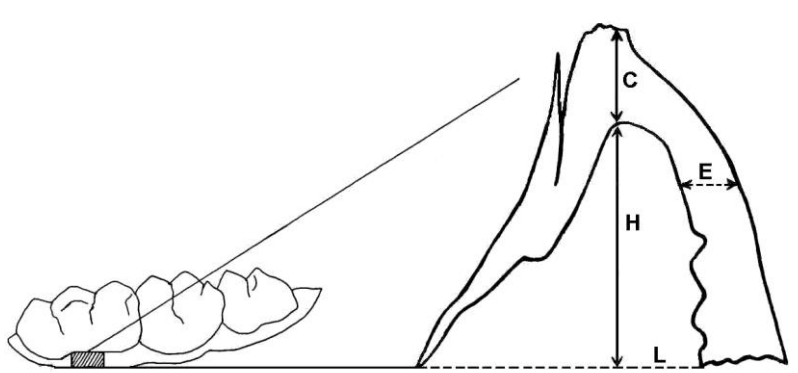


Figura 2.- Esquema da gengiva do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo.

C- altura do epitélio da crista gengival

E – Largura do epitélio bucal

H - altura do tecido conjuntivo na região média

L - largura do tecido conjuntivo na região basal

Análise histológica e contagem de células

Após a obtenção das lâminas histológicas, foi realizada a quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular, partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 100 vezes em imersão no microscópio, sendo feitas duas observações por campo, e então, calculada a média dos valores para cada animal e para cada grupo.

Uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cemento-esmalte também foi realizada. As medidas (em pixels) foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes para então obter-se a média entre os valores. Para isso, utilizou-se um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do software LazEz®.

Análise da expressão da IL-17

Uma porção do tecido gengival ao redor dos dentes, da hemimandíbula do lado esquerdo, submetidos ou não a colocação de ligadura, foi removida e utilizada para análise por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA) da presença da citocina IL-17. Para a dosagem, foram utilizadas placas previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais (Biosource, INVITROGEN®, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas com os sobrenadantes do tecido gengival ou com diferentes concentrações da citocina IL-17 recombinantes, nas concentrações indicadas pelo fabricante. O anticorpo de detecção conjugado à peroxidase específico da citocina foram adicionados às placas, sendo, posteriormente ao tempo de incubação, lavadas e a reatividade revelada pela adição da solução de revelação, seguindo as orientações do fabricante. A reação foi bloqueada com solução de parada e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas. A concentração da citocina foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir de curva padrão realizada para a respectiva citocina. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Análise estatística

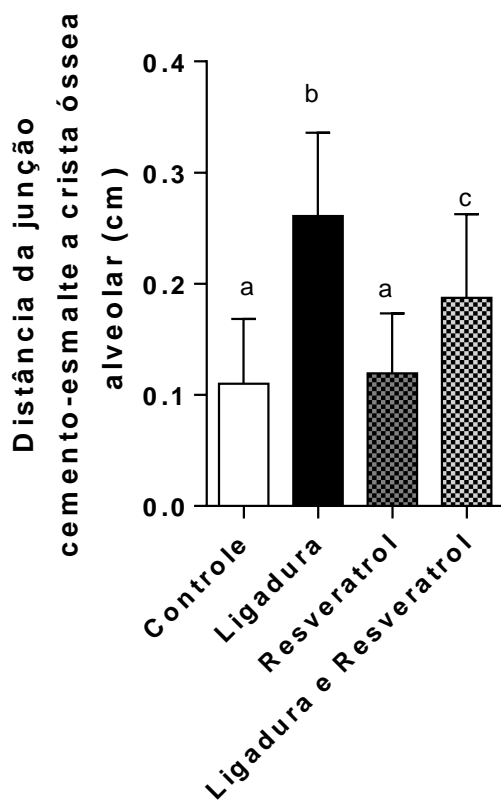
Para a análise estatística, todos os valores numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão. Em um primeiro momento, através do programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamiraua, Amazonas, Brasil), foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição de normalidade dos dados. Posteriormente foram realizados testes paramétricos ANOVA – Oneway seguido por teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%). Os dados foram apresentados na forma de tabelas e gráficos.

1- Resultados

Análise radiográfica e histomorfométrico do osso alveolar

Nas análises, radiográfica (gráfico1) e histomorfométrica (tabela 1) do osso alveolar dos primeiros molares inferiores, verificou-se que nos animais do grupo LIG, houve maior perda óssea alveolar significativa ($p < 0,05$), comprovando a eficácia da indução da doença periodontal sobre o tecido ósseo. Porém, os animais que receberam tratamento com resveratrol, mesmo associado a doença periodontal induzida (LIG RSV), tiveram uma menor perda óssea significativamente ($p < 0,05$), quando comparados aos que não receberam tratamento, sugerindo a hipótese de um efeito protetor do resveratrol frente à doença periodontal. Os grupos controle e resveratrol não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre si.

Gráfico1: Análise radiográfica da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar esquerdo dos ratos de todos os grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em centímetros.



*Letras diferentes, grupos estatisticamente diferentes com $p < 0.05$, após o Teste de ANOVA e teste de TUKEY.

Tabela 1: Análise histomorfométrica da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar esquerdo dos ratos de todos os grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels.

Grupos	Médias \pm desvio padrão
COM	196.07 \pm 43.35 A
LIG	369.38 \pm 76.73 B
RSV	198.38 \pm 25.92 A
LIG-RSV	269.84 \pm 56.21 C

*Letras diferentes, grupos estatisticamente diferentes com $p < 0.05$, após o Teste de ANOVA e teste de TUKEY.

Medida histomorfométrica do tecido gengival

Quando analisadas as medidas da morfometria gengival, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos LIG e LIG-RSV ($p > 0,05$) (tabela 2), bem como entre os grupos CON E RSV. Porém, essas medidas apresentam-se estatisticamente maiores ($p > 0,05$) quando comparadas os grupos de ratos submetidos à ligadura (LIG e LIG-RSV) com os grupos sem periodontite induzida (CON e RSV). Sugerindo que o resveratrol não atuou sobre os tecidos gengivais.

Tabela 2: Análise histomorfométrica da gengiva da hemimandíbula direita dos animais de todos os grupos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em micrômetros (μm).

Grupos	Altura do epitélio da crista gengival (C)	Largura do epitélio bucal (E)	Altura do tecido conjuntivo (H)	Largura do tecido conjuntivo (L)
COM	51.61 \pm 7.10 A	59.83 \pm 5.69 ^a	199.02 \pm 11.80 ^a	98.10 \pm 18.03 A
RSV	51.43 \pm 8.86 A	58.31 \pm 9.18 ^a	196.57 \pm 21.16 ^a	98.07 \pm 14.04A
LIG	62.93 \pm 6.60 B	74.14 \pm 14.25B	228.04 \pm 9.81B	134.04 \pm 20.38B
LIG-RSV	63.92 \pm 6.36 B	75.71 \pm 13.08B	234.67 \pm 21.78B	136.62 \pm 27.29B

*As letras correspondem as comparações dentro do mesmo parâmetro. Letras diferentes: grupos estatisticamente diferentes com $p < 0.05$, após o Teste de ANOVA e teste de TUKEY.

Análise histológica da hemimandíbula direita

Grupo Controle

Na análise histológica deste grupo, os epitélios, oral, juncional e sulcular, assim como o tecido conjuntivo encontraram-se dentro da normalidade, sem a presença de tecido inflamatório. O osso alveolar presente estava intacto, compacto e regular, com porção esponjosa central da aparência normal. Cimento, ligamento periodontal e a junção cimento-esmalte também apresentaram características anatômicas dentro do padrão de normalidade. Foi observado ainda, a presença de osteoblastos e osteoclastos indicando o processo de reabsorção e neoformação óssea, em condição de equilíbrio. As cristas ósseas estavam espessas e a nível do terço cervical da raiz, evidenciado por meio da mensuração da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar (Figura 3-A).

Grupo Ligadura

No grupo LIG foram observadas alterações no cimento e ligamento periodontal, além da crista óssea que se apresentou de forma irregular, com extensa perda óssea alveolar, ocorrendo exposição do terço cervical do dente. Em relação às células ósseas, notou-se a presença acentuada de osteoclastos, revelando a atividade de reabsorção óssea. Os epitélios, oral, juncional e sulcular encontraram-se em estado de anormalidade em relação à sua morfologia, havendo migração para região apical e presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo (Figura 3-C).

Grupo Resveratrol

Neste grupo podemos observar normalidade dos tecidos periodontais e da morfologia dos epitélios oral, juncional e sulcular, bem como no tecido conjuntivo, o qual não apresentou nenhum aspecto inflamatório. Observou-se presença de osteoblastos e osteoclastos em condições de normalidade para os processos de neoformação e reabsorção óssea. A crista óssea manteve-se próxima à JCE, em condições de homeostasia (Figura 3-D).

Grupo Ligadura-Resveratrol

Neste grupo podemos observar pequenas alterações nos epitélios oral, juncional e sulcular, com tecido conjuntivo apresentando aspecto inflamatório. A crista óssea também apresentou irregularidades, tanto em relação à quantidade óssea, onde houve maior reabsorção em relação aos grupos sem periodontite experimental, quanto à sua localização, em que, neste

caso encontrou-se numa altura próxima ao terço cervical do dente. Houve presença aumentada de osteoclastos quando comparado ao grupo Resveratrol, revelando atividade de reabsorção óssea, porém menor do que o grupo LIG (Figura 3- B).

Na quantificação de células ósseas (tabela 3) do osso alveolar dos primeiros molares inferiores, verificou-se que nos animais do grupo LIG houve aumento do número de osteoclastos significativamente ($p < 0.05$), com consequente diminuição significativa do número de osteoblastos e osteócitos ($p < 0.05$). Entretanto, os animais que receberam tratamento com resveratrol, mesmo associado a doença periodontal induzida (LIG-RSV), tiveram uma menor número de osteoclastos e aumento de osteoblastos e osteócitos significativamente ($p < 0,05$) quando comparados aos que não receberam tratamento. Os grupos controle e resveratrol não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0.05$) na quantificação dessas células ósseas.

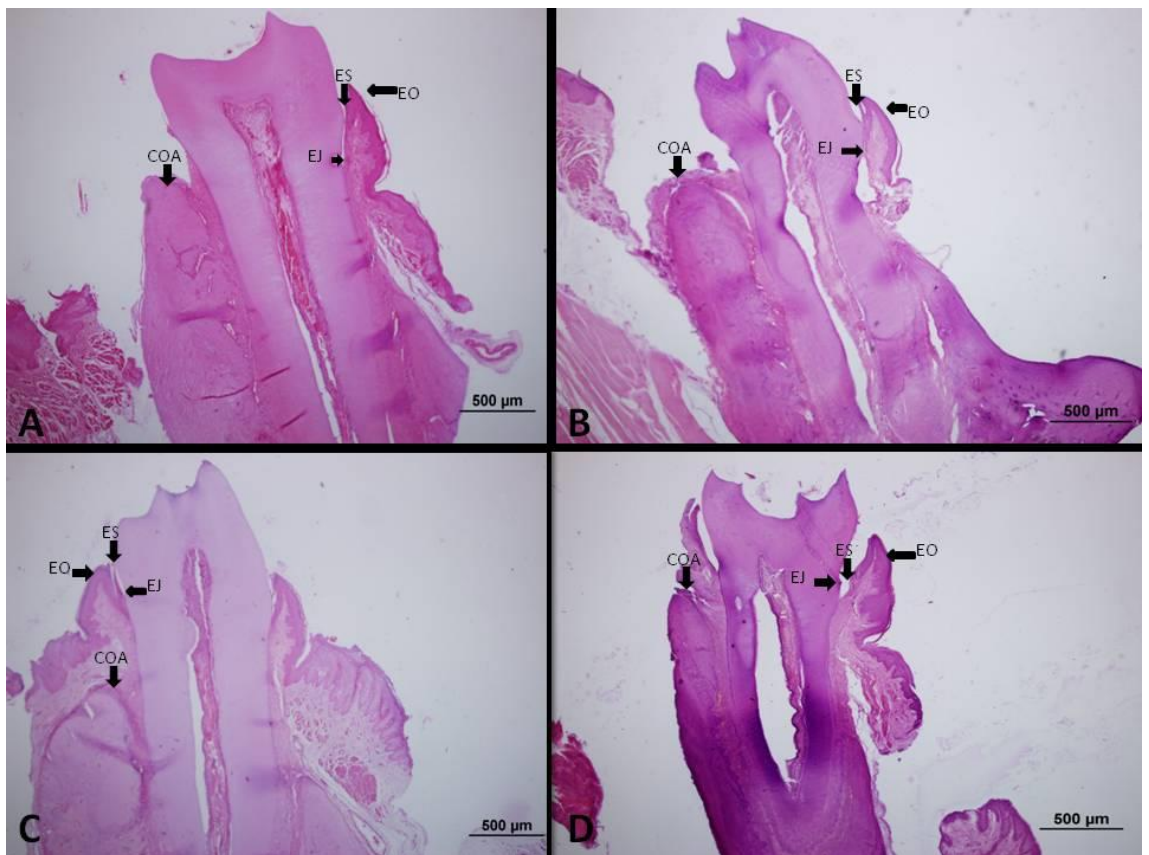


Figura 3: Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CON (A). Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG RSV. (B) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG (C). Fotomicrografia representativa de um animal do grupo RSV (D). COA: Crista óssea alveolar; EJ: Epitélio juncional; ES: Epitélio sulcular; EO: Epitélio oral. Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 40x.

Tabela 3 – Análise histológica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos unidades

	Osteoblasto	Osteócito	Osteoclasto
COM	12.57 \pm 2.14 A	32.23 \pm 9.98 A	0.37 \pm 0.08 A
LIG	6.95 \pm 0.69 B	10.67 \pm 4.62B	3.46 \pm 0.16B
RSV	12.05 \pm 0.63 A	34.25 \pm 12.10 A	0.46 \pm 0.08 A
LIGRSV	8.64 \pm 1.03 C	18.45 \pm 4.23C	1.71 \pm 0.14C

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos, dentro do mesmo parâmetro.

Análise da expressão da IL-17

A concentração de IL-17 foi avaliada a partir do sobrenadante de tecido gengival de animais de todos os grupos. Os resultados demonstraram que a concentração de IL-17 se apresentou maior nos grupos sem resveratrol em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$), demonstrando o resultado positivo do resveratrol sobre essa interleucina (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração de IL-17 nas amostras gengivais dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/mL

Grupos	Médias \pm desvio padrão
COM	27.47 \pm 8.23 A
LIG	41.37 \pm 7.47 B
RSV	12.47 \pm 2.30 C
LIGRSV	15.98 \pm 2.33 D

*Letras diferentes, grupos estatisticamente diferentes com $p < 0,05$, após o Teste de ANOVA e teste de TUKEY.

Discussão

A periodontite é uma doença crônica inflamatória associada à placa subgingival, sendo uma das principais causas da perda dentária (BEREZOW *et al.*, 2011). A mesma leva à formação de bolsas periodontais, que promovem a perda de adesão entre dentes, gengiva e também induz à reabsorção do osso alveolar (NAGASAWA *et al.*, 2007). Atualmente há um crescente interesse na utilização de produtos naturais para prevenir doenças orais, como a doença periodontal (CALIXTO *et al.*, 2004). Dentre esses produtos, o resveratrol é um composto natural, polifenol não flavonóide que está presente em mais de 72 vegetais, podendo apresentar um caráter anti-inflamatório e antimicrobiano no tratamento da doença periodontal (ANDREOU *et al.*, 2004). Logo, nosso estudo buscou uma alternativa terapêutica natural, como o resveratrol, que pudesse ser utilizada para auxiliar na proteção contra a perda óssea alveolar causada pelo desenvolvimento da doença periodontal.

O resveratrol é uma fitoalexina naturalmente produzida por alguns espermatófitos, longamente encontrado na casca de uva vermelha e vinho tinto (FRÉMONT, 2000; WENZEL, 2005). Dentre os diversos benefícios do mesmo, ainda pode interferir positivamente na osteogênese, contribuindo para nova formação óssea (WHITLOCK E BAEK, 2012; BHATT *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; BREEN *et al.*, 2012; TSENG *et al.*, 2011).

A literatura demonstra a relação do resveratrol frente à doença periodontal, como o estudo realizado por Atmanspacher *et al.*, em 2013 o qual teve como objetivo determinar, por meio de avaliações imunoenzimáticas, a influência sistêmica do resveratrol no processo inflamatório da periodontite experimental em ratos pela doença induzida. A IL-17 foi significativamente menor no grupo teste, em que os ratos receberam a administração do polifenol, quando comparado ao grupo controle ($p= 0,014$), corroborando com os resultados de nosso estudo (tabela 4), em que o grupo que recebeu a ligadura associada ao tratamento com resveratrol apresentou menores concentrações desta mesma interleucina, quando comparado ao grupo LIG, sendo também demonstrados nos grupos CON e RSV, onde RSV apresentou menor concentração de IL-17 em relação ao grupo CON. Casati *et al.* (2013) também demonstraram que a ação de modulação exercida pelo resveratrol parece ser atribuída ao seu efeito inibitório sobre a atividade pró-inflamatória na produção de citocinas da resposta imune do tipo Th17, porque a administração deste agente natural promoveu uma redução significativa dos níveis de IL-17.

Segundo Xuzhu *et al.* (2012) e Casati *et al.* (2013), o resveratrol pode inibir diretamente o desenvolvimento de células Th17 ou indiretamente suprimindo a produção das

principais citocinas de polarização Th17 tais como IL-1. De fato, corroborando com o presente estudo, observou-se uma tendência para uma maior inibição desta IL-17 no grupo que recebeu o resveratrol. Assim, embora a inibição da IL-17 tenha sido alcançada principalmente pelo consumo de resveratrol no presente estudo, uma tendência na redução dos níveis de outras citocinas, como a IL-1 β , também pode ter contribuído para o impacto positivo do resveratrol sobre os processos destrutivos do tecido ósseo alveolar (Rizzo *et al.*, 2012; Casati *et al.*, 2013).

Em relação à histomorfometria do osso alveolar, podemos notar que mais uma vez o resveratrol foi eficaz frente à periodontite experimental. Evidenciado tanto na análise radiográfica (gráfico 1), quanto na análise histomorfométrica (tabela 1), em que a distância da JCE até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar esquerdo foi menor nos ratos do grupo LIG-RSV, onde os animais receberam administração diária do resveratrol associado à doença periodontal, quando comparado ao grupo LIG onde os animais não receberam administração do polifenol e tiveram maior perda óssea. Esses achados assemelham-se com os de Casati e seus colaboradores em 2013, em que avaliaram o efeito da administração contínua do resveratrol na progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em 24 ratos. Nestas mesmas análises, os grupos CON e RSV não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

No presente estudo, o resveratrol não influenciou a morfologia dos tecidos gengivais (tabela 2). Quando realizadas as mensurações nos pontos pré-determinados demonstrados na figura 4, os grupos CON e RSV foram estatisticamente semelhantes entre si, bem como os grupos LIG e LIG-RSV, ou seja, os animais que foram induzidos à doença periodontal e os que além da indução receberam a administração do resveratrol como possível terapêutica para doença, não tiveram diferenças estatísticas entre si quando analisada a morfometria gengival. Demonstrando que o polifenol não atuou como agente protetor sobre os tecidos gengivais. Esses dados divergem dos achados de Minagawa *et al* (2015), que demonstraram que o resveratrol suprimiu as respostas inflamatórias das células epiteliais gengivais humanas provavelmente pela supressão de espécies reativas de oxigênio ou inibição do fator nuclear-kB (NF-kB).

Com relação à atividade de reabsorção, podemos notar através da quantificação de células ósseas, demonstrada na tabela 3, que os grupos CON e RSV apresentaram uma quantidade acentuada de osteoblastos e osteócitos e uma quantidade bastante reduzida de osteoclastos, mostrando uma relação de equilíbrio entre o processo de neoformação frente ao de reabsorção óssea em ambos os grupos. Os espécimes do grupo LIG, os quais foram

induzidos à DP, tiveram uma quantidade acentuada de osteoclastos (tabela 3), justificando a grande reabsorção óssea verificada tanto na análise radiográfica (gráfico 1), quanto na análise histomorfométrica (tabela 1). O grupo LIG RSV, apresentou menor quantidade de osteoclastos e maior número de osteoblastos e osteócitos do que os animais do grupo LIG, o que justifica a efetividade do resveratrol em prevenir perda óssea na ligadura. Esses achados corroboram com Bhattarai *et al* em 2016, que estudaram a relação do resveratrol na modulação da inflamação e concluíram através de análise histológica que a administração do resveratrol (5mg/kg de peso corporal) melhorou a perda óssea alveolar mediada por ligadura em ratos.

Embora haja de fato um potencial terapêutico do resveratrol na modulação inflamatória, ainda não estão elucidados quais os mecanismos exatos que essa substância atua para estimular tal efeito. Casati *et al* (2013) em seu estudo afirmam que mecanismos adicionais dessa via precisam de esclarecimento, porém algumas descobertas demonstraram que o resveratrol pode reduzir a expressão de outros marcadores, incluindo IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) $-\alpha$, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interferon (INF) $-\gamma$, em diferentes modelos experimentais, embora muitos outros mediadores inflamatórios (IL-6, IL-8, IL-10, IL-23, INF- γ e TNF- α) e fatores relacionados ao osso (osteoprotegerina [OPG], RANK e RANK ligante [RANKL]) estejam relacionados ao estabelecimento da periodontite. Assim, esses achados podem parcialmente sugerir a modulação da resposta inflamatória imune pelo resveratrol.

O estudo realizado por Bhattarai e seus colaboradores em 2016, teve como um dos objetivos investigar se o resveratrol seria capaz de proteger ratos com um modelo de periodontite induzida por ligadura, contra perda óssea alveolar. Através das análises histológicas e de micro-CT constataram que a administração de 5 mg/kg de peso corporal do polifenol foi eficaz para a diminuição da perda óssea alveolar nesses animais, contribuindo e corroborando com os achados do presente estudo. Além disso, os autores mostraram que o resveratrol, dentre outros benefícios, reduziu a produção de proteínas relacionadas à inflamação e a formação de osteoclastos. Segundo os mesmos autores, esses resultados sugerem que o resveratrol protegeria os ratos do dano tecidual causado pela periodontite, inibindo as doenças inflamatórias e estimulando os sistemas de defesa antioxidante. Com isso, propõem o uso do resveratrol como droga terapêutica para tratamento da periodontite, bem como de outras doenças inflamatórias ósseas, como osteoporose e artrite.

Ainda que estudos adicionais precisem ser realizados, o resveratrol tem sido estudado como uma alternativa terapêutica natural para auxiliar no tratamento da doença

periodontal, como o demonstrado no nosso estudo. Recentemente, Nishii (2017), comprovou clinicamente que a administração sistêmica do polifenol isoladamente foi eficiente para uma redução da profundidade de sondagem e aumento do nível de inserção clínica, promovendo, portanto benefícios clínicos no tratamento periodontal.

Conclusão

Assim pode-se concluir com estes resultados, que a administração do resveratrol poderia provocar um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar de ratos com periodontite experimental e o mesmo atuou positivamente sobre a IL-17. Entretanto não apresentou efeito sobre os tecidos gengivais nos grupos com a presença da doença periodontal.

Referências bibliográficas

1. ATMANSPACHER, C.A., Efeito do resveratrol na liberação de citocinas anti - e pró-inflamatórias na periodontite experimental. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2013, Campinas.. Faculdade Anhanguera de Campinas- Unidade 3, 2013. Disponível em: <<http://conic-semesp.org.br/anais/files/2013/trabalho-1000016119.pdf>> Acesso em: 08 de out. 2018.
2. ANDREOU, V. *et al.* Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. **Journal of Periodontology**. v. 75 n.7, p.939-48, 2004.
3. BASTOS, A. A. *et al.* Obesidade e Doença Periodontal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Intergrada**. v.5. n.3. p. 275-279, 2005.
4. BAUR, J.A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. v. 444, n. 7117, p.337-342, 2006.
5. BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontology** **2000**. v. 55, p. 36–47, 2011.
6. BHATT, S.R.; LOKHANDWALA, M.F.; BANDA, Y. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **European Journal Pharmacology**. v. 667, p.258-64, 2011.
7. BHATTARAI, G. *et al.* Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. **Acta Biomaterialia**. v.29, p.398-408, 2016.
8. BREEN, D. M. *et al.* Resveratrol inhibits neointimal formation after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. **Atherosclerosis**. v.222, n.2, p.375-381, 2012.
9. CALIXTO, J.B. *et al.* Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**. v. 70, p.93-103, 2004.
10. CASATI, Z.M. *et al.* Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulate local levels of cytokines during periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**. v.84, n.10, p. 58-64, 2013.
11. CIRANO, R.F. *et al.* Effect of Resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. **Brazilian Oral Research**. v. 30, n. 1, p.128-35, 2016.
12. CORRÊA, M.G. *et al.* Resveratrol attenuates oxidative stress during experimental periodontitis in rats exposed to cigarette smoke inhalation. **Journal Periodontal Research**. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jre.12622>>. Acesso em: 22 fev.2019.

13. EL-MOWAFY, A, M. *et al.* Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. **Natural Product Research**. v.25, n.8, p. 850-6, 2011.
14. FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**. v.66, n.8, p. 663-73, 2000.
15. FRITZGERALD, A.G.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **The New England Journal of Medicine**. v.245, n.6, p.433-42, 2001.
16. GARLET, G. P. *et al.* Alzheimer's disease and periodontitis – an elusive link. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 60, n. 2, p. 173-180, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v60n2/0104-4230-ramb-60-02-0173.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2016.
17. KALAKONDA, B.; KOPPOLU, P.; BAROUDI, K.; MISHRA, A. Periodontal Systemic Connections-Novel Associations-A Review of the Evidence with Implications for Medical Practitioners. **International Journal of Health Sciences**. v. 10, n. 2, p. 294-307, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4825901/pdf/ijhs-10-2-293.pdf>> Acesso em: 14 jun. 2016.
18. LI, Z. *et al.* Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. **Brain Research**. v. 1450, p.116-124, 2012.
19. LINS, R. D. A. U. *et al.* Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Revista Brasileira de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilo-facial**. v. 7, n.2, p. 29- 36, 2007.
20. MINAGAWA, T. T. *et al.* Resveratrol suppresses the inflammatory responses of human gingival epithelial cells in a SIRT1 independent manner. **Journal of Periodontal Research**. v. 50, n.5, p.586-93, 2015.
21. NAGASAWA, T. *et al.* Roles of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotein in periodontal health and disease. **Periodontology 2000**, v. 43, p. 65-84, 2007.
22. NASCIMENTO, C. M. *et al.* Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. v. 6. p. 365-370, 2013.
23. NASSAR, P. O. *et al.* Simvastatin therapy in cyclosporine A- induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.44 n.4. p. 479-88, 2009.
24. NISHII, D. Efeito clínico do uso sistêmico do resveratrol associado ou não à antibioticoterapia no tratamento da periodontite agressiva generalizada. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, 2017.
25. OLIVEIRA, C.; WATT, R.; HAMER, M. Tooth brushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: results from Scottish Health Survey. **British Medical Journal**. p.1-

- 9, 2010. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/bmj/340/bmj.c2451.full.pdf>>. Acesso em: 09 jul. 2016.
26. POLEPALLE, T. *et al.* Acute phase proteins and their role in periodontitis: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v.9, n.11, p.1-5, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4668538/pdf/jcdr-9-ZE01.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2016.
27. RIZZO, A. *et al.* Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. **Cytokine**. v. 60, n.1, p.197-204, 2012.
28. RODRIGUES, A. Z. *et al.* Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente periodontal. **Revista de Periodontia**. v. 19. n. 1. p. 14- 21, 2009.
29. SAIKO, P. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**. v. 658, p. 663- 73, 2008.
30. SANTOS, T. *et al.* Evidências da interação entre obesidade e doença periodontal: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Periodontology**. v.24. n. 1.p. 35-40, 2014.
31. SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory Mechanisms Linking Periodontal Diseases to Cardiovascular Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 40, n.14, p. 51-69, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554326/pdf/nihms438382.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2016.
32. SCHMATZ, R. *et al.* Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. v.610, p.42-48, 2009.
33. SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8. n. 4. p. 1-3, 2014.
34. TONETTEI, M. S.; CHAPPLE, I. L. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies – Consensus of the Seventh European Workshop Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**. v.38, p.114-18, 2011.
35. TOREGANI, J. F. *et al.* Doença periodontal e aterosclerose. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.13, n.3, p.208-216, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvb/v13n3/pt_1677-5449-jvb-13-03-0208.pdf>. Acesso em: 10 maio 2016.
36. TSENG, P. C. *et al.* Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by up regulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/ FOXO3A axis. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.26, p.2552-63, 2011.

37. VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrasil 2010: abordagem multinível. **Revista de Saúde Pública**. v.47, n.3, p.29-39, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v47s3/en_0034-8910-rsp-47-sup13-00029.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2016.
38. WENZEL E.; SOMOZA, V. Metabolism e bioavailability of *trans*-resveratrol. **Molecular Nutrition & Food Research**. V. 49, p. 472-81, 2005.
39. WHITLOCK, N. C.; BAEK, S. J. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors. **Nutrition and Cancer**. v.64, n.4, p. 593-502, 2012.
40. XUZHU, G. *et al.* Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. In: Rheumatic Diseases. **Anais eletrônicos**. v.71, n.1, 2012. Disponível em: <<https://ard.bmj.com/content/71/1/129.full>>. Acesso em: 22 fev. 2019.

ANEXOS



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais -CEUA

Autorização

O protocolo intitulado“ **Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos à periodontite experimental**”,sob a responsabilidade de **Carlos Augusto Nassar**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais(CEUA) da UNIOESTE em reunião de 14/07/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017-31/03/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico-Wistar
N.de animais	12fêmeas prenhas. A ser informado no relatório final a quantidade de animais que foram efetivamente utilizados.
Peso/Idade	200gramas/100dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIOESTE.

Cascavel, 14/07/2017

Prof. Dra. Luciana Oliveirade Fariña
Coordenadora do CEUA
Portariano 3730/2016- GRE