



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL
DA BERGAMOTA EM MODELO ANIMAL
DE PERIODONTITE**



SÃO LUÍS

2020

AMANDA PEREIRA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA BERGAMOTA EM MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciana Salles Branco de Almeida

SÃO LUÍS

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

MOREIRA, AMANDA PEREIRA.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO
ESSENCIAL DA BERGAMOTA EM MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE /
AMANDA PEREIRA MOREIRA. - 2020.

60 p.

Coorientador(a): LUCIANA SALLES BRANCO DE ALMEIDA.

Orientador(a): MARIA CARMEN FONTOURA NOGUEIRA DA CRUZ.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Odontologia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO
LUÍS - MA, 2020.

1. INFLAMAÇÃO. 2. ÓXIDO NÍTRICO. 3. PERIODONTITE. 4.
REABSORÇÃO ÓSSEA. I. DA CRUZ, MARIA CARMEN FONTOURA
NOGUEIRA. II. DE ALMEIDA, LUCIANA SALLES BRANCO. III.
Título.

AMANDA PEREIRA MOREIRA**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DA BERGAMOTA EM MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia 01 / 12 / 2020, considerou a candidata.

() APROVADO

() REPROVADO

1) Examinadora: Prof. Dra. Giselle Cutrim de Oliveira

2) Examinadora: Prof. Dra. Adriana de Fátima Vasconcelos Pereira

3) Presidente (Orientadora): Profa. Dra. Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ser o propiciador e condutor de oportunidades maravilhosas em minha vida.

Ao meu marido Thiago Moreira, a quem dedico todo este trabalho, por seu amor, parceria e sua inesgotável paciência. Esta vitória é nossa, meu amor!

À família e amigos, agradeço por sua compreensão com minhas ausências ao longo desses dois anos e por muitas vezes assumirem minha função quando não estive presente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal do Maranhão, atualmente na figura do Excelentíssimo Reitor Natalino Salgado Filho, por minha formação e amparo profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Maranhão (PPGO), na pessoa do coordenador Prof. Dr. Bruno Braga Benatti, pela solicitude e competência.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Maranhão que se doam para um enriquecimento e desenvolvimento da nossa instituição.

A todos os professores do Curso de Odontologia da UFMA que contribuíram para minha formação e por todos que são inspiração para a profissional que desejo ser.

A todos os profissionais da Universidade Ceuma, envolvidos direta ou indiretamente na minha pesquisa, com participação fundamental dos professores Lídio Gonçalves, Saulo Mendes.

A minha orientadora professora Maria Carmen Fontoura e minha co-orientadora professora Luciana Salles por terem me conduzido de maneira especial nesses dois anos. Agradeço por me “empurrarem” em algumas situações e por terem “segurado a minha mão” quando foi preciso. Sempre me incentivando diante dos obstáculos.

A toda equipe de pesquisa, coordenada pela professora Luciana Salles, que me acolheu e sempre esteve disponível para que a pesquisa fosse concluída. Agradeço também pelos

momentos divertidos que tivemos juntos e que tornou nosso dia-a-dia mais leve e proveitoso.

Aos meus amigos de mestrado que estiveram comigo nessa jornada de conhecimentos e novas experiências.

Em especial agradeço, a minha amiga e parceira de pesquisa Luciana Naves, por estar sempre presente em todos os momentos que precisei. Até mesmo em plena pandemia. Nunca vou esquecer desses momentos!

Em especial também às minhas amigas e irmãs, Jennifer de Araújo e Patrícia Colins, que dedicaram seu tempo e seus ouvidos para me escutarem e me confortarem nos momentos mais difíceis e que não me deixaram desistir. Agradeço por compartilharem de alegrias e momentos especiais em minha vida.

Não podia esquecer dos meus amigos Hassan Lavalier e Cássio Bernard, com seus conselhos e sua sabedoria infinita. Foi muito especial conhecer vocês e poder participar de suas vidas.

A equipe da secretaria da PPGO, em especial a Mayara, por todo cuidado e disponibilidade durante estes dois anos, que foi fundamental para facilitar nosso contato e comunicação.

A toda equipe da conservadora e segurança, que cuidam do nosso acesso e manutenção do nosso prédio, fundamental para o desenvolvimento de nossos trabalhos.

Por fim, agradeço a todos imensamente, palavras são poucas para definir o que sinto dentro do meu coração. Serei sempre grata a vocês!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma com o delineamento experimental do estudo34
- Figura 2.** Hemimandíbula corada com azul de metileno para visualização da Junção cemento-esmalte (JCE) 35
- Figura 3a.** Resultados da avaliação de pesos dos animais nos grupos Controle, Ligadura e Ligadura + BEO durante diferentes etapas do período experimental (*baseline*, 3, 7 e 14 dias) 36
- Figura 3b.** Resultados dos pesos dos animais do grupo Ligadura + BEO durante o período do experimento 37
- Figura 4.** Resultados da avaliação de proteínas totais no tecido gengival de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO 38
- Figura 5.** Resultados da avaliação da produção de óxido nítrico (NO) no tecido gengival de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO 39
- Figura 6.** Resultados da avaliação da perda óssea alveolar de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa <i>in silico</i> da absorção, da biodisponibilidade oral, dos efeitos tóxicos, DL ₅₀ e classe de toxicidade dos principais compostos do BEO.....	41
--	----

RESUMO

A periodontite consiste em uma doença inflamatória crônica caracterizada por inflamação tecidual associada com perda progressiva de inserção gengival, reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional. A saúde periodontal necessita de um estado imuno-inflamatório controlado que possa manter a homeostase na relação microrganismo-hospedeiro; porém na periodontite, a resposta imune do hospedeiro é desregulada. Um mediador inflamatório que parece exercer papel fundamental na evolução da periodontite é o óxido nítrico (NO), que é um radical livre produzido a partir da L-arginina pela ação de enzimas denominadas óxido nítrico sintases. Estímulos inflamatórios ativam a iNOS (óxido nítrico sintase induzíveis) em várias células, incluindo osteoclastos e osteoblastos, resultando no aumento da produção de NO nos tecidos e atuando na reabsorção óssea. Algumas estratégias terapêuticas baseadas no uso de extratos vegetais têm sido investigadas para modulação da resposta inflamatória, inclusive na periodontite. Nessa perspectiva, o óleo essencial de bergamota (BEO) tem mostrado resultados promissores e desta forma, a hipótese levantada no presente estudo é que o uso do BEO apresenta efeito anti-inflamatório e reduz a perda óssea alveolar sugerindo potencial ação adjuvante na terapia periodontal mecânica em modelo de periodontite induzida. As propriedades anti-inflamatórias do BEO foram avaliadas por meio de um estudo *in vivo* em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos e uma análise *in silico* dos principais compostos do BEO (acetato de linalil e o linalol) para verificar possíveis vias de absorção, biodisponibilidade oral e efeitos tóxicos. Um total de 24 ratos Wistar machos foram incluídos no estudo e divididos em 3 grupos: 1) Grupo Controle (n=8): ratos sem ligadura que receberam gavagem diária com veículo (DMSO 2%); 2) Grupo ligadura (n=8): ratos com ligadura que receberam gavagem diária com veículo; 3) Grupo ligadura + BEO (n=8): ratos com ligadura que receberam gavagem diária com BEO (0,1 ml/kg em veículo). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e as amostras de tecidos gengivais em torno dos primeiros molares inferiores, bem como as hemimandíbulas, foram coletadas e armazenadas. Análises da concentração de proteínas totais e da produção de óxido nítrico foram realizadas. A reabsorção óssea foi avaliada por método morfométrico na região mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos. O teste ANOVA seguido de Tukey foi utilizado na análise estatística, adotando o nível de significância de 5%. Em relação a concentração de proteínas totais, os grupos ligadura e ligadura + BEO apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Os grupos ligadura e ligadura + BEO também apresentaram maior produção de NO no tecido gengival quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Com relação a reabsorção

óssea alveolar, observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo ligadura + BEO quando comparado ao grupo ligadura. Na análise *in silico*, os compostos do BEO demonstram alta absorção gastrointestinal e estão de acordo com os critérios da regra de Lipinski. O acetato de linalil apresentou DL_{50} de 12000 mg/kg e classe 6 de toxicidade. Os achados sugerem que o uso de BEO pode reduzir a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida por ligadura, mesmo sem ter reduzido a produção de NO no tecido gengival. Os principais compostos do BEO apresentaram alta absorção gastrointestinal, boa biodisponibilidade oral e baixo potencial de toxicidade.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Reabsorção óssea. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Periodontitis consists of a chronic inflammatory disease characterized by tissue inflammation associated with progressive loss of gingival insertion, bone resorption and apical migration of the junctional epithelium. Periodontal health needs a controlled immune-inflammatory state that can maintain homeostasis in the microorganism-host relationship; however, in periodontitis, the host's immune response is deregulated. An inflammatory mediator that seems to play a fundamental role in the evolution of periodontitis is nitric oxide (NO), which is a free radical produced from L-arginine by the action of enzymes called nitric oxide synthases. Inflammatory stimuli activate iNOS (inducible nitric oxide synthase) in several cells, including osteoclasts and osteoblasts, resulting in increased production of NO in the tissues and acting on bone resorption. Some therapeutic strategies based on the use of plant extracts have been investigated to modulate the inflammatory response, including periodontitis. From this perspective, bergamot essential oil (BEO) has shown promising results and, therefore, the hypothesis raised in the present study is that the use of BEO has an anti-inflammatory effect and reduces alveolar bone loss suggesting potential adjunctive action in mechanical periodontal therapy in an induced periodontitis model. The anti-inflammatory properties of BEO were evaluated by means of an *in vivo* study in a model of ligature-induced periodontitis in rats and an *in silico* analysis of the main compounds of BEO (linalyl acetate and linalool) to verify possible absorption routes, oral bioavailability and toxic effects. A total of 24 male Wistar rats were included in the study and divided into 3 groups: 1) Control Group (n = 8): rats without ligature that received daily gavage with vehicle (DMSO 2%); 2) Ligature group (n = 8): rats with ligature that received daily gavage with vehicle; 3) Ligature + BEO group (n = 8): rats with ligature that received daily gavage with BEO (0.1 ml / kg in vehicle). After 15 days, the animals were sacrificed and samples of gingival tissues around the lower first molars, as well as the hemimandibles, were collected and stored. Analyzes of total protein concentration and nitric oxide production were performed. Bone resorption was evaluated by morphometric method in the mesial region of the first left lower molars. The ANOVA test followed by Tukey was used in the statistical analysis, adopting a significance level of 5%. Regarding the total protein concentration, the ligature and ligature + BEO groups showed a significant increase when compared to the control group (p <0.05). The ligature and ligature + BEO groups also showed higher NO production in the gingival tissue when compared to the control group (p <0.05). Regarding alveolar bone resorption, there was a

statistically significant reduction ($p < 0.05$) in the ligature + BEO group when compared to the ligature group. In the *in silico* analysis, the BEO compounds demonstrate high gastrointestinal absorption and are in accordance with the criteria of the Lipinski rule. Linalyl acetate showed LD₅₀ of 12000 mg / kg and class 6 toxicity. The findings suggest that the use of BEO can reduce alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis, even without reducing NO production in the gingival tissue. The main compounds of BEO showed high gastrointestinal absorption, good oral bioavailability and low potential for toxicity.

Keywords: Periodontitis. Inflammation. Bone resorption. Nitric oxide.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO I -	17
2.1. INTRODUÇÃO	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1. Animais	20
2.2.2. Indução da periodontite, tratamentos e período experimental	21
2.2.3. Coleta e armazenamento das amostras	21
2.2.4. Preparo dos tecidos gengivais	21
2.2.5. Avaliação da concentração de proteínas totais no tecido gengival	22
2.2.6. Avaliação da produção de NO no tecido gengival	22
2.2.7. Avaliação morfológica da reabsorção óssea alveolar	22
2.2.8. Avaliação <i>in silico</i>	23
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
2.4. RESULTADOS	24
2.4.1. Avaliação do peso dos animais	24
2.4.2. Avaliação da concentração de proteínas totais no tecido gengival	24
2.4.3. Avaliação da produção de óxido nítrico no tecido gengival	24
2.4.4. Avaliação morfológica da reabsorção óssea alveolar	24
2.4.5. Avaliação <i>in silico</i> dos principais compostos do BEO	25
2.5. DISCUSSÃO	25
2.6. CONCLUSÃO	28
2.7. REFERÊNCIAS	28
FIGURAS E TABELAS	34
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A - Parecer do Comitê Ético em Pesquisa de Animais	48
ANEXO B - Normas do Periódico Journal of Periodontal Research	53

1. INTRODUÇÃO

A periodontite consiste em uma doença inflamatória crônica caracterizada por inflamação tecidual, associada com perda progressiva de inserção gengival, reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional (CHENG et al., 2014; KINANE et al., 2017; PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI et al., 2018).

Muitas bactérias participam do processo de rompimento da homeostase microbiana com o hospedeiro e a identificação dessas bactérias demonstraram a capacidade das mesmas em prejudicar o sistema de defesa inato (HUANG et al., 2001; JI et al., 2007). No processo de disbiose, a alteração que ocorre tanto no biofilme dental quanto na expressão gênica de mediadores inflamatórios e imunológicos do hospedeiro, resultando em um estado inflamatório intenso, o qual propicia o dano tecidual observado na periodontite (KINANE et al., 2017; PAPAPANOU et al., 2018).

O ambiente subgengival é intensamente infiltrado por mediadores imunológicos e inflamatórios (NUSSBAUM et al., 2011; YILMAZ, 2008) e manutenção da saúde periodontal depende de um estado imuno-inflamatório controlado que possa manter a homeostase na relação microrganismo-hospedeiro (DARVEAU, 2014; KORNMAN et al., 1997; LAPPIN, D. F. et al., 2000). Na periodontite, a resposta imune do hospedeiro é desregulada e, portanto, torna-se ineficaz na invasão bacteriana e a patogenicidade acaba se manifestando (HAJISHENGALLIS et al., 2012).

Essa resposta inflamatória é caracterizada pela ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios em células de tecido inflamado, bem como leucócitos recrutados no sangue. O fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) é um regulador da resposta inflamatória que impulsiona a ativação de genes associados à transcrição de mediadores inflamatórios, como: interleucinas (IL), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e prostaglandinas (PGs), bem como enzimas inflamatórias, tais como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenases (COXs) (FERLAZZO et al., 2016).

A iNOS é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) por meio de células epiteliais e inflamatórias em resposta a citocinas pró-inflamatórias (FORSTERMANN; SESSA, 2012; LAPPIN et al., 2000). O óxido nítrico (NO) é um radical livre produzido a partir da L-arginina pela ação de enzimas denominadas iNOS (LAPPIN et al., 2000). Estímulos inflamatórios ativam a iNOS em várias células, incluindo osteoclastos e osteoblastos, resultando no aumento da produção de NO nos tecidos e atuando na reabsorção óssea (BORKAR; BHUTADA;

PANDAGALE, 2016). Este infiltrado pode penetrar mais profundamente até destruir os tecidos de suporte periodontal (DI BENEDETTO et al., 2013; KIRKWOOD et al., 2007), promovendo a reabsorção óssea alveolar que se apresenta como característica predominante na periodontite (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Embora o NO tenha uma função antimicrobiana protetora, sua concentração elevada nos tecidos tem um efeito citotóxico para as células hospedeiras (UĞAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006).

Modelos animais com periodontite induzida por ligadura são utilizados para recriar esse ambiente disbiótico. Esse modelo foi descrito pela primeira vez em 1966 (ROVIN; COSTICH; GORDON, 1966) e é atualmente considerado um dos modelos animais mais usados em pesquisa periodontal, especialmente para estudar a influência dos fatores de risco na progressão da doença (DUARTE et al., 2004; SAKALLIOĞLU et al., 2008) e para testar o efeito de diferentes abordagens terapêuticas (JIN et al., 2007; MENEZES et al., 2005).

O modelo consiste na inserção de uma ligadura (fio) de algodão, seda ou náilon na região subgingival dos molares (maxilares ou mandibulares) de ratos para permitir o acúmulo de biofilme, induzindo alterações nos tecidos periodontais semelhantes as observadas na periodontite em humanos, incluindo migração apical de epitélio juncional, influxo de células inflamatórias, ruptura de fibras do ligamento periodontal e perda óssea (DUARTE et al., 2004; GALVÃO et al., 2003; ROVIN; COSTICH; GORDON, 1966; WU et al., 2020).

No intuito de aperfeiçoar o tratamento da periodontite, medidas terapêuticas assertivas devem ser adotadas. Observamos que a terapia mecânica quando utilizada isoladamente, consegue resultados benéficos a longo prazo para a maioria dos pacientes (HEITZMAYFIELD; LANG, 2013). Porém, uma quantidade pequena, entretanto significativa, podem não responder adequadamente a este tipo de tratamento (GRAZIANI et al., 2017).

Para esses pacientes, as terapias sistêmicas foram sugeridas como complementares aos procedimentos mecânicos e químicos convencionais realizados, possibilitando assim uma modulação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (GRAZIANI et al., 2017). Um produto já comercialmente disponível e aprovado para uso clínico nos EUA, é o Periostat®, que é a dose diária de doxiciclina 20 mg. A doxiciclina, da família dos antibióticos, inibe a metaloproteinase de matriz, que é uma enzima dependente de zinco e é capaz de degradar uma grande variedade de proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno. Para a maioria dos pacientes é prescrito um único curso de dose subantimicrobiana de doxiciclina, por 3 meses, em conjunto com o início da terapia não-cirúrgica, com o objetivo de não inibir completamente

a atividade da metaloproteinase de matriz, mas modular os níveis patológicos destas que estão associadas à periodontite (PRESHAW, 2017).

Outra possibilidade que vem sendo pesquisada são os inibidores da óxido nítrico sintase (NOS). Estes demonstraram possuir efeitos protetores contra a reabsorção óssea alveolar na periodontite induzida em ratos (LEITÃO et al., 2005; LOHINAI et al., 1998) após o uso de um inibidor seletivo de iNOS - mercaptoetilguanidina – confirmaram que o NO tem um papel deletério na fisiopatologia da periodontite e que sua modulação pode prevenir a destruição tecidual.

Frente à necessidade de explorar novos medicamentos com possível efeito anti-inflamatório sobre os tecidos periodontais, os produtos de origem natural têm sido estudados como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos, incluindo fármacos moduladores da resposta do hospedeiro (FREIRES; ROSALEN, 2016). Essa busca deve ser por fármacos que possibilitem novas modalidades de tratamento periodontal complementar, que sejam eficazes e de baixo custo, que tenham bom rendimento, que possam ser bem absorvidos por via oral e que possuam baixa toxicidade.

Nesse sentido, um produto natural promissor é o óleo essencial de bergamota (BEO), produzido por meio da prensagem a frio da casca da *Citrus bergamia Risso et Poiteau* (NAVARRA et al., 2015). Este óleo essencial é composto por terpenos aromáticos voláteis e derivados oxigenados, tais como o linalol e o acetato de linalil (KUWAHATA et al., 2013). É normalmente utilizado nas indústrias cosméticas, na composição de muitas fragrâncias, loções corporais, sabonetes, nas indústrias alimentares para aromatizar chá, bebidas e doces, nas indústrias farmacêuticas (para absorver o odor desagradável dos medicamentos e pelas suas propriedades anti-sépticas e antibacterianas) (CIRMI et al., 2016), assim como na aromaterapia (NAVARRA et al., 2015).

Pesquisadores começaram a investigar as propriedades biológicas dos derivados da bergamota e sugeriram que estes possuam potencial efeito neuroprotetor (CORASANITI et al., 2007), antiproliferativo (CELIA et al., 2013; NAVARRA et al., 2015), anti-inflamatório e analgésico (IMPELLIZZERI et al., 2015; NAVARRA et al., 2015). Estes últimos, foram descritos, também, por Karaca et al. (2007) em modelo de edema de pata induzido por carragenina, onde encontraram 63,39% de redução do edema quando usaram o BEO a 0,1 mL / kg.

Devido à grande importância econômica dos compostos do gênero *Citrus*, o qual a bergamota faz parte, estudos têm sido realizados e notaram que existe uma grande variação na composição química dos óleos cítricos devido às diferenças de origem, contexto genético, estação, clima, idade, estágio de maturação, método de extração, entre outros. (DOSOKY; SETZER, 2018). Na revisão sistemática de Perna et al., 2019, mostra que os subprodutos da bergamota - suco, óleo essencial e outros - são pesquisados usando administrações por via inalatória, intraplantar e oral. Porém, ainda não possuem estudos na literatura que utilizem o BEO por via oral para controle da inflamação periodontal.

Alguns dos compostos majoritários do BEO, como o acetato de linalil e o linalol, os quais também estão presentes em outros óleos essenciais, vem demonstrando um potencial efeito anti-inflamatório, mesmo que em diferentes modelos de indução de inflamação (AOE et al., 2017; KHODABAKHSH; SHAFAROODI; ASGARAPANAH, 2015; LOMBARDO et al., 2020; PEANA et al., 2002; RAI et al., 2020).

Por exemplo, como no óleo essencial de chinotto (CEOs), de forma taxonômica relacionada à bergamota, o linalol e o acetato de linalil presentes reduziram a produção de NO, a expressão de genes inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS, citocinas, incluindo interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), e proteína quimiotática de monócitos de quimiocina-1 (MCP-1) por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) (PLASTINA et al., 2018).

Sendo assim, este trabalho investigou o efeito do tratamento com o BEO em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos, avaliando o potencial deste óleo essencial na modulação da resposta imuno-inflamatória, bem como seus efeitos sobre a reabsorção óssea alveolar. Em acréscimo, realizou-se a avaliação *in silico* dos principais compostos do BEO a fim de investigar suas possíveis vias de absorção, biodisponibilidade oral e efeitos tóxicos, pois os estudos encontrados com BEO utilizam outras vias de administração (KARACA et al., 2007; SAKURADA et al., 2009; SCUTERI et al., 2019), que não a oral.

1. CAPÍTULO I

Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial da bergamota em modelo animal de periodontite

Artigo formatado conforme normas do periódico Journal of Periodontal Research.

Amanda Pereira Moreira*; Luciana Salles Branco-de-Almeida*; Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz*

* Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

Amanda Pereira Moreira, Mestre, Universidade Federal do Maranhão.

Luciana Salles Branco-de-Almeida, MSc, PhD, Professora Adjunta, Universidade Federal do Maranhão.

Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz, Dra, Professora Associada, Universidade Federal do Maranhão.

Fonte de apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não apresentar nenhum conflito de interesse.

Correspondência: Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz. Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Avenida dos Portugueses, S/N, Campus Universitário do Bacanga, CEP: 65.085-580, São Luís, MA, Brazil. Fax: +55 98 33018572. E-mail: ma.carmen@uol.com.br

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Reabsorção óssea. Óxido nítrico.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de bergamota (BEO) sobre o processo inflamatório e a reabsorção óssea alveolar relacionados à periodontite induzida por ligaduras em ratos. Realizar uma análise *in silico* dos principais compostos presentes neste óleo essencial. **Material e Método:** O estudo *in vivo* foi realizado em 24 ratos Wistar machos, submetidos à indução de periodontite pela inserção de ligadura em torno dos primeiros molares inferiores. Os animais foram divididos em 3 grupos: 1) Grupo Controle (n=8): ratos sem ligadura que receberam gavagem diária com veículo (DMSO 2%); 2) Grupo ligadura (n=8): ratos com ligadura que receberam gavagem diária com veículo; 3) Grupo ligadura + BEO (n=8): ratos com ligadura que receberam gavagem diária com óleo essencial de bergamota (0,1 ml/kg em veículo). Após 15 dias, estes foram sacrificados e as amostras de tecidos gengivais em torno dos primeiros molares inferiores e as hemimandíbulas foram coletadas e armazenadas. Análises da concentração de proteínas totais e da produção de óxido nítrico (NO) no tecido gengival dos animais foram realizadas utilizando-se o método de Bradford e reação de Griess, respectivamente. A reabsorção óssea alveolar foi avaliada por método morfométrico, mensurando-se as distâncias lineares entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea (CO) na região mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos. Os principais compostos do óleo essencial de bergamota, acetato de linalil e o linalol, foram analisados *in silico* quanto às possíveis vias de absorção, biodisponibilidade oral e toxicidade ao organismo. O teste ANOVA seguido de Tukey foi utilizado na análise estatística, adotando o nível de significância de 5%.

Resultados: Em relação a concentração de proteínas totais, os grupos ligadura e ligadura + BEO apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$). Os grupos ligadura e ligadura + BEO também apresentaram maior produção de NO no tecido gengival quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Com relação a reabsorção óssea alveolar, observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo ligadura + BEO quando comparado ao grupo ligadura. Na análise *in silico*, os principais compostos do BEO demonstram alta absorção gastrointestinal e estão de acordo com os critérios da regra de Lipinski. O acetato de linalil apresentou DL_{50} de 12000mg/kg e classe 6 de toxicidade.

Conclusão: O BEO reduziu a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida por ligadura, sem reduzir a produção de NO no tecido gengival. Os compostos principais do BEO apresentaram alta absorção gastrointestinal, boa biodisponibilidade oral e baixo potencial de toxicidade.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Reabsorção óssea. Óxido nítrico.

2.1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com perda progressiva de inserção, reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional^(1,2). É desencadeada devido à infecção prolongada causada pelo biofilme subgingival, capaz de mediar cascatas imuno-inflamatórias locais e sistêmicas⁽³⁾.

Essa resposta inflamatória é caracterizada pela ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios em células de tecido inflamado, bem como leucócitos recrutados no sangue⁽⁴⁾.

Um mediador inflamatório que parece ter um importante papel na progressão da periodontite é o NO⁽⁵⁾ que é um radical livre produzido a partir da L-arginina pela ação de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS)⁽⁶⁾. O NO pode modular a atividade de osteoblastos e osteoclastos⁽⁵⁾, sendo sugerido que o mesmo contribua para o aumento do infiltrado inflamatório e da destruição dos tecidos periodontais. Embora o NO tenha uma função antimicrobiana protetora, sua concentração elevada nos tecidos tem um efeito citotóxico para as células hospedeiras⁽⁷⁾.

Fármacos baseados em antimicrobianos e anti-inflamatórios não-esteróides atraíram considerável interesse das pesquisas⁽⁸⁾, no entanto, eles possuem vários efeitos colaterais prejudiciais⁽⁴⁾. Para limitar esta desvantagem, o uso de medicamentos fitoterápicos, nutracêuticos e suplementos alimentares aumentaram muito como uma forma de medicina alternativa e / ou complementar para o tratamento de várias doenças, incluindo as inflamatórias⁽⁹⁾.

A humanidade beneficiou-se, empiricamente de medicamentos naturais para tratar ou prevenir um amplo espectro de doenças. De fato, os produtos naturais representam uma fonte potencial e valiosa para o desenvolvimento de medicamentos e produtos no manejo de doenças, entre elas as que acometem a cavidade oral⁽¹⁰⁾. Atualmente, há uma busca por fármacos que possibilitem novas modalidades de tratamento, atuando na modulação da resposta imuno-inflamatória e em particular, na periodontite⁽¹¹⁾. Essa busca deve ser por fármacos que possibilitem novas modalidades de tratamento, que sejam eficazes e de baixo custo, tenham bom rendimento, que possam ser bem absorvidos por via oral e que possuam baixa toxicidade.

Nesse sentido, um produto natural promissor é o óleo essencial de bergamota (BEO), produzido através da prensagem a frio da casca da *Citrus bergamia Risso et Poiteau*⁽¹²⁾. Este óleo essencial é composto por terpenos aromáticos voláteis e derivados oxigenados, tais como o linalol e o acetato de linalil⁽¹³⁾.

Pesquisadores começaram a investigar as propriedades biológicas dos derivados da bergamota e sugeriram que estes possuem potencial efeito neuroprotetor⁽¹⁴⁾, antiproliferativo^(12,15), anti-inflamatório e analgésico^(12,16). Estes últimos, sido descritos, também, por Karaca et al., 2007⁽¹⁷⁾ em teste de edema de pata induzido por carragenina, onde encontraram 63,39% de redução no edema quando usaram o BEO a 0,10 mL / kg. Alguns dos principais compostos do BEO, como acetato de linalil e o linalol, vêm demonstrando um potencial efeito anti-inflamatório, mesmo que, em diferentes modelos de indução de inflamação ou até, em outros óleos essenciais, nos quais também possuem esses compostos⁽¹⁸⁻²²⁾.

Por exemplo, como no óleo essencial de chinotto (CEOs), de forma taxonômica relacionada a bergamota, o linalol e o acetato de linalil presentes reduziram a produção de NO, expressão de genes inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), citocinas, incluindo interleucina-1 β (IL -1 β) e interleucina-6 (IL-6), e proteína quimiotática de monócitos de quimiocina-1 (MCP-1) por macrófago estimulado por LPS⁽²³⁾.

Sendo assim, este trabalho investigou o efeito do tratamento com BEO em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos, avaliando o potencial deste óleo essencial na atuação da modulação da resposta imuno-inflamatória, bem como seus efeitos sobre a reabsorção óssea alveolar. Em acréscimo, realizou-se a avaliação *in silico* dos principais compostos do BEO a fim de investigar suas possíveis vias de absorção, biodisponibilidade oral teórica e efeitos tóxicos possíveis, pois os estudos encontrados com BEO utilizam outras vias de administração^(17,24,25) que não a oral.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Animais

Um estudo experimental em modelo animal de periodontite induzida, conforme figura 1, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Ceuma (Maranhão, Brasil) e teve início somente após a sua aprovação sob o protocolo 110/19.

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), provenientes do biotério da Universidade Ceuma (Maranhão, Brasil), com idade de aproximadamente 8 semanas e peso entre 300 g e 400 g. Os animais receberam ração balanceada e água *ad libitum* durante todo o período em que estiveram acondicionados no biotério. A temperatura da sala foi mantida a 22° \pm 1 °C, sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas. Foi utilizado o ARRIVE como guia para as diretrizes de todo o experimento animal⁽²⁶⁾.

2.2.2. Indução da periodontite, tratamentos e período experimental

Para indução da periodontite, os animais foram anestesiados, previamente, utilizando-se soluções de cloridrato de ketamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal.

Em seguida, foi inserido um fio de algodão (Corrente 10, Brasil), chamado de “ligadura”, passando-se pelo espaço interproximal, em torno dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos a nível do sulco gengival^(27,28). Animais sem ligadura foram utilizados como grupo controle.

Os animais foram, aleatoriamente, divididos em 3 grupos: 1) Grupo Controle (n=8 animais): Ratos sem ligadura que receberam gavagem diária com veículo (DMSO 2%); 2) Grupo Ligadura (n= 8 animais): Ratos com ligadura que receberam gavagem diária com veículo (DMSO 2%); 3) Grupo Ligadura + BEO (n=8 animais): Ratos com ligadura que receberam gavagem diária com BEO a 0,1 ml/kg em veículo⁽¹⁷⁾. O BEO foi adquirido comercialmente (Sigma[®]) e sua concentração testada foi definida com base em suas ações anti-inflamatórias descritas na literatura^(29,30).

Os animais receberam gavagem oral diária com veículo e/ou com BEO no primeiro dia após a indução da periodontite e por um período de 14 dias. As doses eram reduzidas /aumentadas de acordo com os pesos dos animais. Estes, foram pesados no *baseline*, 3, 7 e 14 dias do experimento. Foi realizado o acompanhamento de peso e condições clínicas dos animais com o objetivo de avaliar o efeito da medicação testada durante o período experimental.

Os animais foram sacrificados por indução de anestesia profunda após 15 dias do início do experimento e respectivos tratamentos realizados^(31,32).

2.2.3. Coleta e armazenamento das amostras

Os tecidos gengivais em torno dos primeiros molares inferiores direitos foram coletados com o auxílio de lâmina de bisturi 15C e armazenados a -80°C para avaliação da produção de NO e dosagem de proteínas totais. Logo após, as hemimandíbulas foram armazenadas em formaldeído 10% para avaliação da reabsorção óssea alveolar por análise morfométrica^(33,34).

2.2.4. Preparo dos tecidos gengivais

Inicialmente, os tecidos gengivais do lado direito foram homogeneizados utilizando-se solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (150 µL em cada amostra) juntamente com esferas de aço introduzidas em tubos individuais. Os tecidos foram submetidos à maceração com o auxílio de um extrator automático (Tissue Lyser LT - QIAGEN, Alemanha) durante o período

de 20 minutos. Logo após, foi realizada a centrifugação (Centrífuga Novatecnica – NT 820) das amostras homogeneizadas por 10 min/2000 g para coleta dos sobrenadantes.

2.2.5. Avaliação da concentração de proteínas totais no tecido gengival

O método de Bradford⁽³⁵⁾ foi utilizado para esta avaliação, sendo todas as fases deste método feitas em uma placa de 96 poços. Realizou-se uma curva-padrão de albumina nesta placa e, em cada poço, colocou-se 25 µL da amostra e 200 µL do reagente de Bradford (corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250) (diluição 1:4). As amostras passaram por um período de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. A leitura de absorvância foi feita utilizando-se um espectrofotômetro (Microplate reader MB-580, Heales) a 630 nm.

2.2.6. Avaliação da produção de NO no tecido gengival

Para esta avaliação, os sobrenadantes obtidos do tecido gengival dos animais foram analisados quanto à produção de NO²⁻ e NO³⁻ usando o reagente de Griess (0,1% de n-1-naftil-dihidrocloridrato etilenodiamina em 5% de ácido fosfórico e 1% de sulfanilamida), o qual foi adicionado às amostras (50 µl do reagente / 50 µl do sobrenadante) em uma placa de 96 poços. Nitrito de sódio (NaNO₂) foi utilizado para a confecção da curva-padrão. Após um período de 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente e protegidos da luz, foi realizada a leitura da absorvância com um espectrofotômetro a 550 nm (Microplate reader MB-580, Heales)⁽³⁶⁾.

2.2.7. Avaliação morfológica da reabsorção óssea alveolar

Para esta avaliação, as hemiarcadas esquerdas foram, inicialmente, imersas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% por 2 horas⁽³³⁾. Em seguida, todo o tecido mole remanescente foi retirado das mesmas. Para visualização da JCE, todas as peças foram coradas com uma mistura de azul de metileno e água destilada (1g/100ml) por 30 minutos. Logo após, as peças foram lavadas em água corrente para remoção do excesso do corante (Figura 2).

Em seguida, as hemimandíbulas foram observadas em lupa estereoscópica (uEye, Alemanha) em aumento de 40 vezes, sendo posicionadas de forma que ocorresse a sobreposição das cúspides vestibulares e linguais, não havendo a possibilidade de visualização da superfície oclusal. As hemimandíbulas foram digitalizadas e mensuradas com auxílio do software Ueye cockpit.

A avaliação da perda óssea alveolar foi feita pela mensuração da distância entre JCE e a CO da região lingual das hemimandíbulas, sendo seguida a inclinação radicular⁽³³⁾. As mensurações foram obtidas na região mesial do primeiro molar pelo lado lingual destas

hemimandíbulas.

Além disso, as mensurações foram feitas por um único avaliador calibrado, sendo que o mesmo não tinha conhecimento dos grupos avaliados, pois foi realizada uma randomização prévia para caracterizar a avaliação como duplo-cego.

2.2.8. Avaliação *in silico*

Esta avaliação computacional foi realizada com auxílio de programas com bancos de dados on-lines. Onde, de acordo com o CAS (Chemical Abstracts Service) do BEO (8007-75-8), foram selecionados os principais compostos dessa substância (acetato de linalil – 30 a 60% e linalol – 11 a 22%) e foram verificadas possíveis vias de absorção, biodisponibilidade oral e toxicidade no organismo.

Para avaliação das possíveis vias de absorção, foram selecionadas estimativas de absorção gastrointestinal, permeabilidade através da barreira hematoencefálica e permeação através da pele (log Kp em cm / s). Foi utilizado o programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>)⁽³⁷⁾ para esta avaliação. Para avaliar o log Kp, quanto mais negativo for o valor encontrado, menos permeável à pele é a molécula.

A verificação quanto a biodisponibilidade oral teórica desses principais compostos, foi realizada por meio do programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>)⁽³⁷⁾. Este programa fornece informações sobre as seguintes propriedades: 1) Área de superfície polar total - TPSA; 2) Coeficiente de partição (água / óleo) – iLogP; 3) Peso molecular – MW; 4) Número de receptores de hidrogênio - nALH e 5) Número de doadores de hidrogênio - nDLH. Com a finalidade de prever a biodisponibilidade oral dos principais compostos do BEO, seus valores de TPSA, iLogP, peso molecular, nALH e nDLH foram analisados baseados na "Regra dos Cinco"⁽³⁸⁾, onde para apresentar uma boa estimativa, uma molécula precisa atender aos requisitos de pelo menos três dos parâmetros analisados: 1) TPSA <140 Å²; 2) iLogP ≤ 5; 3) MW <500 dáltons; 4) nALH ≤ 10, e 5) nDLH ≤ 5.

Por último, foi realizada a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dos compostos majoritários do BEO por meio do programa Osiris (www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html)⁽³⁷⁾.

Esses parâmetros obtidos foram avaliados através da comparação das estruturas químicas dos compostos com um banco de dados contendo medicamentos disponíveis comercialmente. Os efeitos tóxicos foram classificados como mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e se possuíam efeitos na reprodução.

Os valores de DL₅₀ em mg / kg foram estimados usando o programa PROTOX (http://tox.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input) e classificados quanto a toxicidade das substâncias⁽³⁹⁾.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EUA) e foram apresentados como médias e desvio-padrão (DP). A normalidade das variáveis foi realizada usando o teste de Shapiro-Wilk. Comparações entre os grupos foram realizadas usando ANOVA One-Way seguido por teste de Tukey com nível de significância de 5%.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Avaliação do Peso dos animais

Como mostra a Figura 3a, os diferentes grupos apresentavam animais com pesos similares no *baseline* e em todo o período experimental ($p > 0,05$). A inserção da ligadura promoveu leve tendência à queda de peso nos animais no dia 3, porém sem diferença estatisticamente significativa. ($p > 0,05$). Os animais continuaram ganhando peso até o final do experimento.

A Figura 3b mostra que não houve perda de peso ao longo do experimento relacionado ao tratamento com o BEO; ao contrário, os animais tiveram ganho de peso quase significativo em relação aos outros grupos aos 7 e 14 dias.

2.4.2. Avaliação da concentração de proteínas totais no tecido gengival

Na análise de proteínas totais, observou-se que os grupos onde os animais receberam ligadura apresentaram um aumento da concentração de proteínas totais do tecido gengival em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos Ligadura e Ligadura + BEO ($p > 0,05$) (Figura 4).

2.4.3. Avaliação da produção de óxido nítrico no tecido gengival

Na análise da produção de NO nos tecidos gengivais, não houve variação estatisticamente significativa entre os três grupos ($p > 0,05$) (Figura 5).

2.4.4. Avaliação morfométrica da reabsorção óssea alveolar

As hemimandíbulas apresentaram uma maior perda óssea nos grupos que receberam

ligadura em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Observou-se, também, uma redução na reabsorção óssea alveolar, com diferença estatisticamente significativa, no grupo de animais tratados com BEO comparado ao grupo ligadura ($p < 0,05$) (Figura 6).

2.4.5. Avaliação *in silico* dos principais compostos do BEO

Em relação a absorção, a tabela 1 mostra que os compostos apresentaram uma alta absorção no trato gastrointestinal e apresentaram permeabilidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Com relação a permeabilidade na pele ($\log K_p$) todos apresentaram resultados negativos, demonstrando que estes compostos possuem baixa permeabilidade na pele.

Esta mesma tabela demonstra que os principais compostos, acetato de linalil e o linalol, se enquadram nos critérios para apresentar boa estimativa de biodisponibilidade oral, de acordo com a Regra dos Cinco⁽³⁸⁾.

E, em relação a avaliação de toxicidade nos principais compostos do BEO, ficou demonstrado na tabela 1, que o acetato de linalil não apresenta nenhum dos efeitos descritos. Entretanto, o linalol pode apresentar altos efeitos mutagênicos e irritantes.

O DL_{50} do acetato de linalil foi de 12000 mg/kg. E em relação à classe de toxicidade, o acetato de linalil foi classificado como não tóxico.

2.5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo mostram que o tratamento oral com óleo essencial de bergamota reduziu a reabsorção óssea alveolar nas hemimandíbulas de ratos submetidos a um modelo de periodontite induzida por ligadura^(28,40,41), apesar de não termos encontrado uma redução da produção de NO nos tecidos gengivais. Além disso, o BEO mostrou ter boa absorção gastrointestinal, boa biodisponibilidade oral e não ser tóxico. Em conjunto, esses achados não apenas confirmam a potencial capacidade anti-inflamatória do BEO, mas também são os primeiros a demonstrar uma possibilidade terapêutica complementar promissora na doença periodontal.

Os derivados da bergamota vêm sendo pesquisados como uma possibilidade de apresentar efeitos terapêuticos em relação a doenças inflamatórias⁽⁴⁾. Na revisão sistemática de PERNA et al., 2019⁽⁴²⁾, mostra que os subprodutos da bergamota - suco, óleo essencial e outros - são pesquisados usando administrações por via inalatória, intraplantar e oral. Porém, ainda

não possuem estudos na literatura que utilizem o BEO por via oral para controle da inflamação periodontal.

Este presente estudo mostra que o tratamento oral com óleo essencial de bergamota modulou positivamente a reabsorção óssea alveolar em ratos que foram submetidos a um modelo de periodontite induzida por ligadura. O modelo de indução que foi utilizado em nosso estudo é bem consolidado na literatura^(32,40,41) e demonstra ser bem efetivo quando comparamos grupos controle com grupos onde a periodontite foi induzida⁽⁴³⁾.

Para confirmar a efetividade deste modelo, foi realizada a análise da concentração de proteínas totais no tecido gengival dos animais. Nesta análise, observou-se que nos grupos onde os animais foram induzidos à periodontite por ligadura, estes apresentaram um aumento da concentração de proteínas totais do tecido gengival em relação ao grupo controle. Portanto, este modelo de indução de periodontite por ligadura mostra-se efetivo nos grupos avaliados e corrobora com outros estudos que utilizaram este mesmo método de indução^(32,40,41).

O BEO e seus principais compostos mostraram possuir uma atividade anti-inflamatória promissora, pois ele conseguiu reduzir a reabsorção óssea alveolar das hemimandíbulas dos animais que receberam essa substância por gavagem oral. Esta redução na reabsorção óssea alveolar, com diferença estatisticamente significativa, foi encontrada no grupo de animais tratados com BEO quando comparado ao grupo ligadura. Esses resultados corroboram com o estudo *in vitro* de Han et al., 2017⁽⁴⁴⁾ onde verificou-se que o BEO conseguiu inibir significativamente os 17 marcadores estudados (MCP-1, VCM-1, ICAM-1, IP-10, I-TAC, IL-8, MIG, Colágeno I e III, EGFR, MMP-1, PAI-I, TIMP-1 e 2, M-CSF, proliferação e citotoxicidade) que estão relacionados às moléculas inflamatórias bem como à remodelação tecidual.

Entretanto, o BEO não teve uma atividade demonstrada sobre a produção do óxido nítrico no tecido gengival dos animais no presente estudo. Em contraste com o estudo de Graziano et al., 2012⁽⁴⁵⁾, onde ensaios realizados em queratinócitos demonstraram que CBE (extrato de *Citrus bergamia Risso and Poiteau*) não inibiu a proliferação celular e conseguiu reduzir significativamente a produção de NO entre outros.

O NO é muito relevante na periodontite pois funciona como um marcador biológico e seus níveis podem assumir papel deletério na osteoclastogênese. Altos níveis de NO inibem tanto a reabsorção quanto a formação óssea e podem extinguir a renovação óssea na inflamação grave⁽⁴⁶⁾. De acordo com Borkar et al., 2016⁽⁵⁾, são encontradas baixas concentrações de NO no tecido saudável e funcionam como uma barreira protetora dos tecidos adjacentes aos dentes. Provavelmente, o NO se mostre prejudicial quando produzido em maiores quantidades durante

a inflamação, levando tanto a uma destruição do tecido quanto das bactérias presentes. Apesar de não termos encontrado uma atividade considerável do BEO sobre a produção de óxido nítrico, encontramos uma redução na reabsorção óssea alveolar, o que sugere que o óleo essencial de bergamota possui uma ação positiva sobre a inflamação.

Por isso, recomenda-se que sejam avaliados novos mediadores inflamatórios ou até o próprio óxido nítrico só que a nível de expressão gênica. Pesquisas já mostram efeitos positivos na inativação seletiva do óxido nítrico, a nível de expressão gênica, atuando como possível modulador nas doenças orais^(7,47,48).

Em relação à dose utilizada no experimento, esta mostrou-se adequada de acordo com o parâmetro dos pesos dos animais que não apresentou mudança significativa, e também por mostrar, na análise *in silico*, do acetato de linalil, DL₅₀ de 12000 mg/kg e ser classificado como não tóxico. O que corrobora com o estudo *in vivo* realizado por Jenner et al., 1964⁽⁴⁹⁾, onde referiu que o acetato de linalil possui DL₅₀ oral de 14550 mg/kg em ratos, valor semelhante ao encontrado em nosso estudo.

A análise *in silico* também mostrou que os compostos majoritários apresentam uma alta absorção no trato gastrointestinal e possuem boa disponibilidade oral, sugerindo que o BEO possa ser absorvido, de uma forma segura, também por via oral em contraste com os estudos que encontramos na literatura^(17,24,25) que adotaram outras vias de administração. Já o resultado a respeito da reabsorção óssea alveolar, corrobora com a análise anterior, pois demonstra que o BEO foi bem absorvido por via oral pelos animais, apresentando concentrações eficazes para uma ação terapêutica anti-inflamatória e de prevenção da reabsorção óssea alveolar inflamatória.

O acetato de linalil não apresenta risco de provocar efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e na reprodução. Mas, a análise *in silico* sugere que o linalol demonstra risco de provocar efeitos mutagênicos e irritantes quando avaliado de forma isolada. Porém, neste estudo, o linalol encontrava-se diluído no óleo essencial, o que torna mais seguro o seu uso.

Sabe-se, também que os monoterpenos, entre os quais o linalol e acetato de linalil, principais compostos do BEO, possuem capacidade anti-inflamatória e analgésica^(21,50,51). Portanto, pelo menos em parte, os efeitos anti-inflamatório e analgésico do BEO poderiam ser atribuíveis a estes compostos, embora, este estudo não tenha como objetivo investigar qual substância isolada seria responsável por esses resultados e sim, utilizar esses compostos diluídos em óleo.

Baseado na hipótese levantada e nos resultados obtidos, o uso do BEO apresenta efeito anti-inflamatório e reduz a perda óssea alveolar em modelo de periodontite induzida, podendo

ter um papel promissor como adjuvante na terapia periodontal mecânica. Mais pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os mecanismos de atuação deste óleo essencial nas diferentes vias da resposta inflamatória. Podendo investigar outros mediadores inflamatórios ou mesmo o óxido nítrico a nível de expressão gênica para obter resultados mais consolidados, análises as quais não conseguimos realizar neste estudo.

2.6. CONCLUSÃO

É sugerido que o BEO tenha ação sobre a reabsorção óssea nos animais que utilizaram essa substância por via oral, apesar de não haver correlação com os achados sobre o NO. Os compostos principais do BEO apresentaram alta absorção gastrointestinal, boa biodisponibilidade oral e baixo potencial de toxicidade.

2.7. REFERÊNCIAS

1. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76(11(Suppl.)):2033–41.
2. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev [Internet]*. 2017;3(17038):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
3. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2015;15:30–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3785>
4. Ferlazzo N, Cirmi S, Calapai G, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Navarra M. Anti-inflammatory activity of Citrus bergamia derivatives: where do we stand? *Molecules*. 2016;21(1273):1–11.
5. Borkar SP, Bhutada G, Pandagale S. Nitric oxide- An inflammatory biomarker in oral and periodontal diseases. *International J Oral Heal Med Res*. 2016;3(2):76–80.
6. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodont Res*. 2000;35:369–73.
7. Uğar-Çankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta*. 2006;366:90–100.
8. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol* 2000. 2017;75(1):152–88.

9. Marino A, Paterniti I, Cordaro M, Morabito R, Campolo M, Navarra M, et al. Role of natural antioxidants and potential use of bergamot in treating rheumatoid arthritis. *PharmaNutrition* [Internet]. 2015;3:53–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2015.03.002>
10. Chinsebu KC. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.019>
11. Freires IA, Santaella GM, Cássia J De, Sardi O, Rosalen PL. Archives of oral biology the alveolar bone protective effects of natural products : a systematic review. *Arch Oral Biol J*. 2018;87:196–203.
12. Navarra M, Mannucci C, Delbò M, Calapai G. Citrus bergamia essential oil : from basic research to clinical application. *Front Pharmacol*. 2015;6:1–7.
13. Kuwahata H, Komatsu T, Katsuyama S, Corasaniti MT, Bagetta G, Sakurada S, et al. Peripherally injected linalool and bergamot essential oil attenuate mechanical allodynia via inhibiting spinal ERK phosphorylation. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2013;103:735–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.11.003>
14. Corasaniti MT, Maiuolo J, Maida S, Fratto V, Navarra M, Russo R, et al. Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;151:518–29.
15. Celia C, Trapasso E, Locatelli M, Navarra M, Ventura CA, Wolfram J, et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;112:548–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.017>
16. Impellizzeri D, Bruschetta G, Di Paola R, Ahmad A, Campolo M, Cuzzocrea S, et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* [Internet]. 2015;34:1146–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2014.11.012>
17. Karaca M, Özbek H, Him A, Tütüncü M, Akkan HA, Kaplanoglu V. Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. *Eur J Gen Med*. 2007;4(4):176–9.
18. Khodabakhsh P, Shafaroodi H, Asgarpanah J. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus aurantium* L. blossoms essential oil (neroli): Involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. *J Nat Med*. 2015;69(3):324–

- 31.
19. Lombardo GE, Cirimi S, Musumeci L, Pergolizzi S, Maugeri A, Russo C, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of bergamot essential oil and its antinociceptive effects. *Plants*. 2020;9(704):1–17.
 20. Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MDL. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 2002;9:721–6.
 21. Rai VK, Sinha P, Yadav KS, Shukla A, Saxena A, Bawankule DU, et al. Anti-psoriatic effect of *Lavandula angustifolia* essential oil and its major components linalool and linalyl acetate [Internet]. Vol. 113127, *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113127>
 22. Aoe M, Ueno-Iio T, Shibakura M, Shinohata R, Usui S, Arao Y, et al. Lavender essential oil and its main constituents inhibit the expression of *tnf- α* -induced cell adhesion molecules in endothelial cells. *Acta Med Okayama*. 2017;71(6):493–503.
 23. Plastina P, Apriantini A, Meijerink J, Witkamp R, Gabriele B, Fazio A. In vitro anti-inflammatory and radical scavenging properties of chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) essential oils. *Nutrients*. 2018;10(783):1–13.
 24. Scuteri D, Rombol L, Morrone LA, Bagetta G, Sakurada S, Sakurada T, et al. Neuropharmacology of the neuropsychiatric symptoms of dementia and role of pain : essential oil of bergamot as a novel therapeutic approach. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3327):1–13.
 25. Sakurada T, Kuwahata H, Katsuyama S, Komatsu T, Morrone LA, Corasaniti MT, et al. Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. *Int review Neurobiol* [Internet]. 1st ed. 2009;85:237–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85018-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85018-6)
 26. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting : the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):1–6.
 27. Branco-de-Almeida LS, Vieira MS, Anbinder AL, Castro ML, Cortelli SC, Galvão-Moreira L V, et al. Protective effects of desipramine on alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2020;00:1–10.
 28. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodont Res*.

- 1966;1:193–203.
29. Bagetta G, Morrone L, Rombolà L, Amantea D, Russo R, Berliocchi L, et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia* [Internet]. 2010;81:453–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.013>
 30. Berliocchi L, Russo R, Levato A, Fratto V. (–)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in C57 / BL6 mice. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 1st ed. 2009;85:221–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85017-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85017-4)
 31. Castro ML, Franco GCN, Branco-de-Almeida LS, Anbinder AL, Cogo-Müller K, Cortelli SC, et al. Down-regulation of protease activated receptor 2, interleukin-17, and other pro-inflammatory genes by subantimicrobial doxycycline dose in a rat periodontitis model. *J Periodontol*. 2016;87(2):203–10.
 32. Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(5):664–71.
 33. Foureaux RDC, Messoria MR, Marques LS, Oliveira LFF de, Pereira LJ, Zangerônimo MG, et al. Comparação de métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse TT - Comparison of methods for measurement of periodontal bone loss in rats submitted to stress. *Arq odontol*. 2014;50(4):185–92.
 34. Souza DM, Prado FA, Prado MA, Rocha RF, Carvalho R. Avaliação da perda óssea periodontal em ratos por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. *Braz J Periodontol*. 2011;21(03):67–73.
 35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
 36. Mendes SJF, Sousa FIAB, Pereira DMS, Ferro TAF, Pereira ICP, Silva BLR, et al. Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2016;34:60–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.012>
 37. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Reportsts* [Internet]. 2017;(March):1–13. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>
38. Lipinski CA. Lead - and drug-like compounds : the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):337–41.
 39. Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox : a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014;3–8.
 40. Holzhausen M, Jr CR, Jr EM, Nassar PO. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature- induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002;73(9):1030–6.
 41. Nociti Jr FH, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MAN, Tramontina VA, Barros SP, et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis . *J Periodontol.* 2000;71(9):1460–4.
 42. Perna S, Spadaccini D, Botteri L, Girometta C, Riva A, Allegrini P, et al. Efficacy of bergamot : From anti- -inflammatory and anti- - oxidative mechanisms to clinical applications as preventive agent for cardiovascular morbidity , skin diseases , and mood alterations. *Food Sci Nutr.* 2019;7:369–84.
 43. Molon RS De, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 2018;81:1412–21.
 44. Han X, Beaumont C, Stevens N, Parker TL. Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells. *Biochim Open* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2017.04.001>
 45. Graziano ACE, Cardile V, Crascì L, Caggia S, Dugo P, Bonina F, et al. Protective effects of an extract from *Citrus bergamia* against inflammatory injury in interferon-gamma and histamine exposed human keratinocytes. *Life Sci* [Internet]. 2012;90:968–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.04.043>
 46. Van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *PNAS.* 2002;97(14):7993–8.
 47. Leitão RFC, Ribeiro RA, Chaves H V, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005;76(6):956–63.
 48. Lohinai Z, Benedek P, Fehér E, Györfi A, Rosivall L, Fazekas Á, et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 1998;123:353–60.

49. Jenner PM, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Fd Cosmet Toxicol.* 1964;2:327–43.
50. Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti MDL, Serra G, Pippia P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol.* 2003;460:37–41.
51. Sá RCDSE, Andrade LN, De Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules.* 2013;18:1227–54.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Fluxograma com o delineamento experimental do estudo.

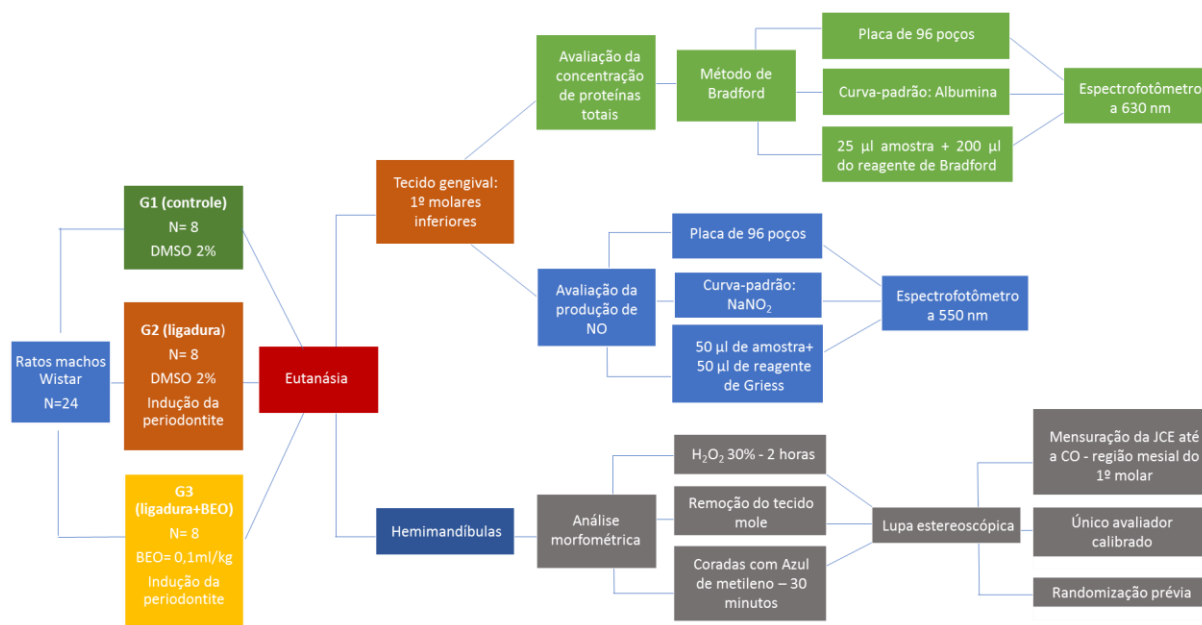


Figura 2 – Hemimandíbula corada com azul de metileno para visualização da Junção cemento-esmalte (JCE).

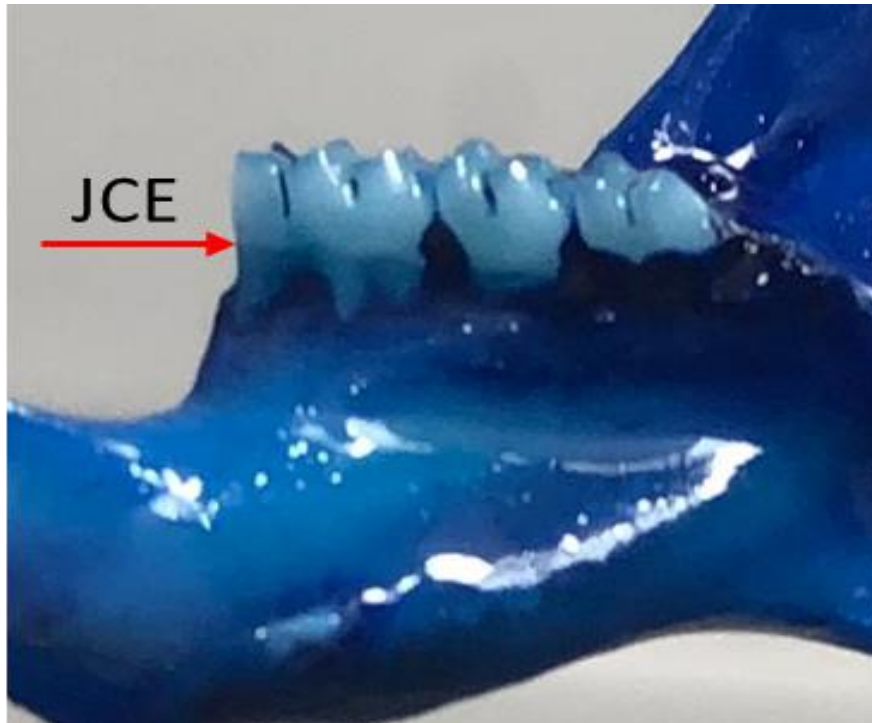


Figura 3a. Resultados da avaliação de pesos dos animais nos grupos Controle, Ligadura e Ligadura + BEO durante diferentes etapas do período experimental (baseline, 3, 7 e 14 dias). Os dados foram expressos através de médias \pm DP (n = 8 animais por grupo). $p > 0.05$ quando comparado com o grupo controle de acordo com o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

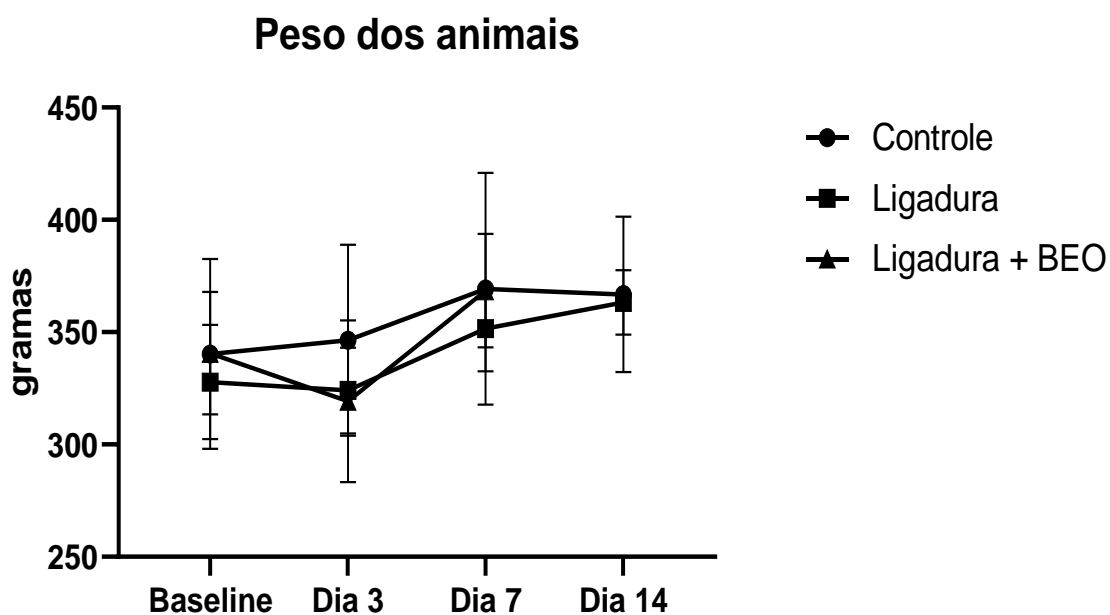


Figura 3b. Resultados dos pesos dos animais do grupo Ligadura + BEO durante o período do experimento. Os dados foram expressos através de médias \pm DP (n = 8 animais no grupo). $p > 0.05$ quando comparado entre os diferentes dias de pesagem de acordo com o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

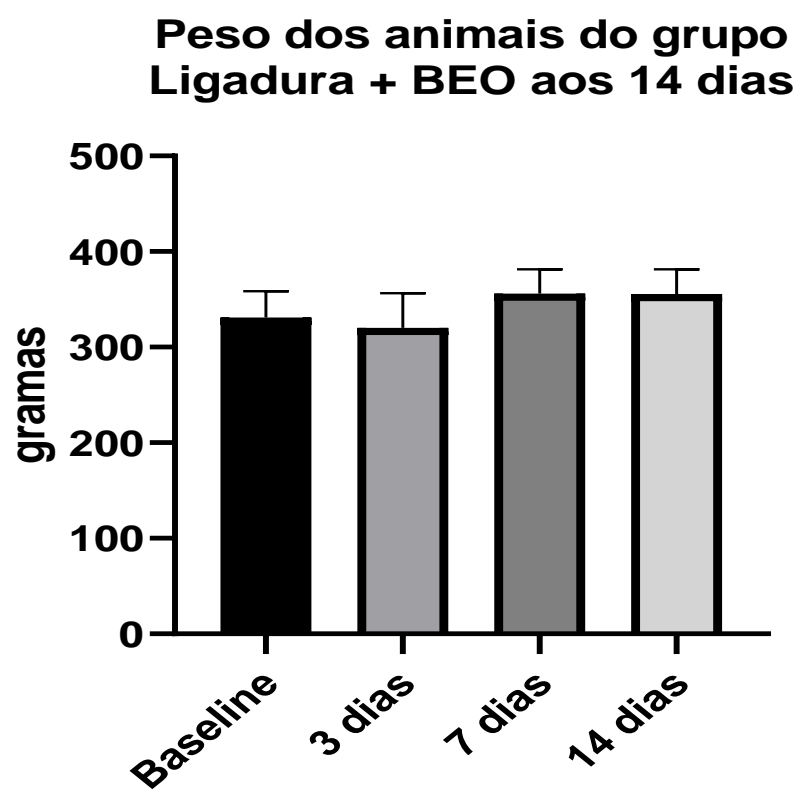


Figura 4. Resultados da avaliação de proteínas totais no tecido gengival de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO. Os dados foram expressos através de médias \pm DP (n = 8 animais por grupo). *p < 0.05 quando comparado com o grupo controle de acordo com o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Proteínas Totais no Tecido Gengival

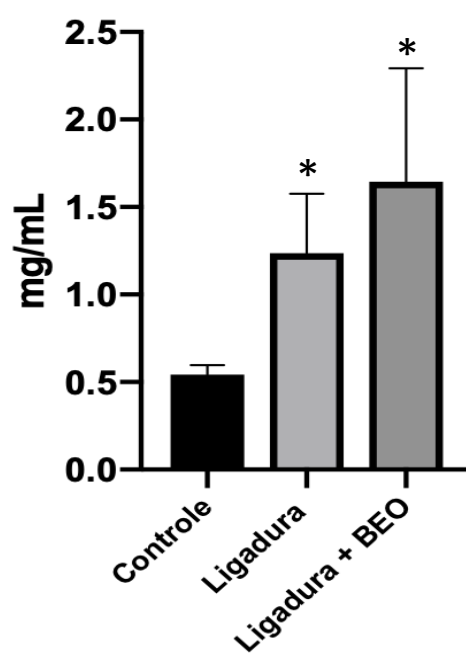


Figura 5. Resultados da avaliação da produção de óxido nítrico (NO) no tecido gengival de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO. Os dados foram expressos através de médias \pm DP (n = 8 animais por grupo). Nenhuma diferença estatística entre os grupos foi detectada pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Óxido Nítrico no Tecido Gengival

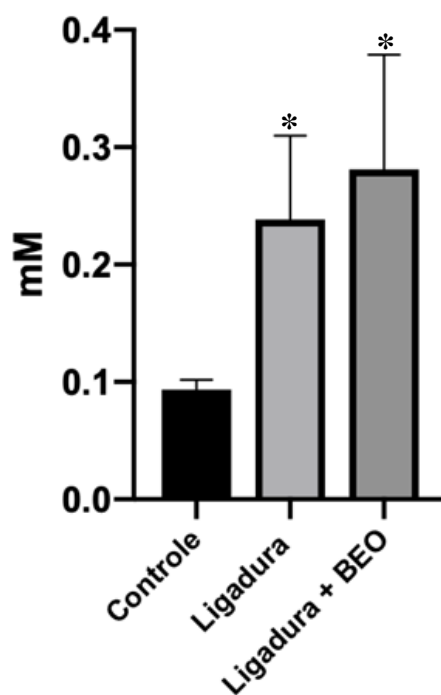


Figura 6. Resultados da avaliação da perda óssea alveolar de animais com periodontite induzida por ligadura e tratados com BEO. Os dados foram expressos através de médias \pm DP (n = 8 animais por grupo). Houve diferença estatística entre os grupos detectada pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *p < 0.05 quando comparamos com o grupo controle; †p < 0.05 quando comparados ao grupo controle e ligadura.

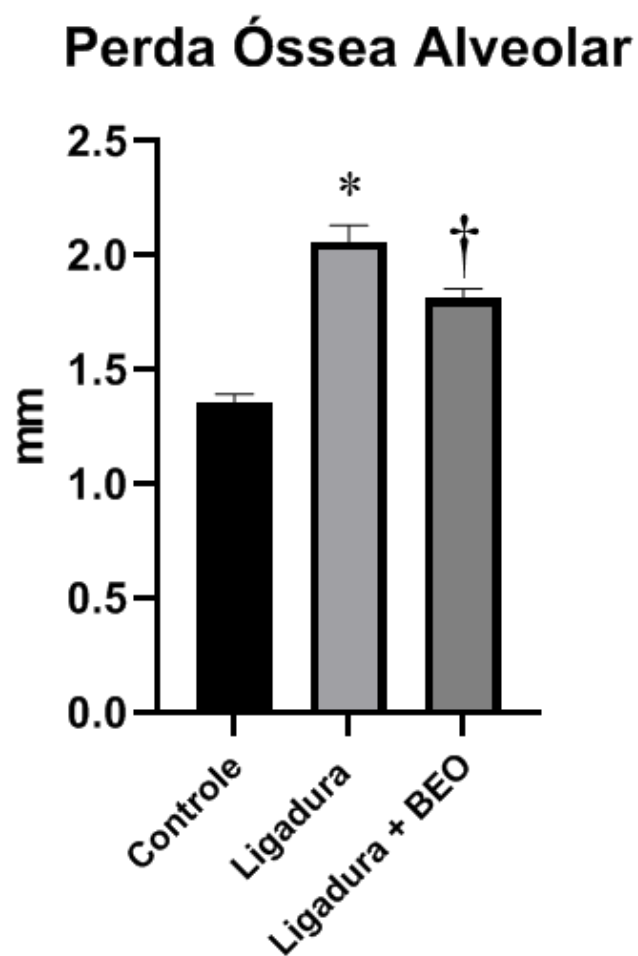


Tabela 1 - Estimativa *in silico* da absorção, da biodisponibilidade oral, dos efeitos tóxicos, DL₅₀ e classe de toxicidade dos principais compostos do BEO.

1. ESTIMATIVA DA ABSORÇÃO	Acetato de <u>Linalil</u>	<u>Linalol</u>
Absorção Gastrointestinal	Alta	Alta
Permeabilidade na barreira hematoencefálica	Sim	Sim
Log <u>K_p</u> (cm/s) - índice de permeação na pele	-4,71	-5,13
2. ESTIMATIVA DA BIODISPONIBILIDADE ORAL		
<u>iLogP</u> - índice de lipofilicidade	3.08	2.70
MW (g/mol) - peso molecular	196.29	154.25
TPSA (Å ²) - área da superfície polar total	26.30	20.23
<u>nDLH</u> - número de doadores de hidrogênio	0	1
<u>nALH</u> - número de receptores de hidrogênio	2	1
3. ESTIMATIVA DE EFEITOS TÓXICOS, DL ₅₀ E CLASSE DE TOXICIDADE		
Efeitos mutagênicos	Nenhum	Alto
Efeitos <u>tumorigênicos</u>	Nenhum	Nenhum
Efeitos irritantes	Nenhum	Alto
Efeitos na reprodução	Nenhum	Nenhum
DL ₅₀ (mg/kg) - dose letal 50%	12000	-
Classe de toxicidade	6	-

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No modelo *in silico*, observou-se que os compostos majoritários presentes no BEO podem ser bem absorvidos pelo trato gastrointestinal e possuem boa biodisponibilidade oral e no modelo *in vivo*, observou-se um aumento na concentração de proteínas totais nos grupos de animais com ligadura e uma redução na reabsorção óssea alveolar no grupo ligadura + BEO quando comparado ao grupo ligadura porém, o tratamento com o BEO não reduziu a produção de NO nos tecidos gengivais dos animais. Deve-se, portanto, investigar outros mediadores inflamatórios ou até mesmo o óxido nítrico a nível de expressão gênica para constatar se existe atuação do BEO na redução da produção de NO.

Mais pesquisas devem ser realizadas no intuito de estabelecer quais os mecanismos e substâncias possam estar envolvidas na ação anti-inflamatória do BEO sobre a reabsorção óssea alveolar.

Uma grande contribuição do nosso estudo foi em mostrar que a administração por via oral do BEO consiste em uma nova possibilidade segura. Diferentemente de estudos anteriores que adotavam somente as vias intraplantar e inalatória para a administração do BEO.

REFERÊNCIAS

- AOE, M. et al. Lavender essential oil and its main constituents inhibit the expression of TNF- α -induced cell adhesion molecules in endothelial cells. **Acta Medica Okayama**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 493–503, 2017.
- BORKAR, S. P.; BHUTADA, G.; PANDAGALE, S. Nitric oxide- An inflammatory biomarker in oral and periodontal diseases. **International Journal of Oral Health and Medical Research**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 76–80, 2016.
- CELIA, C. et al. Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 112, p. 548–553, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.017>>
- CHENG, W. C.; HUGHES, F. J.; TAAMS, L. S. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 41, p. 541–549, 2014.
- CIRMI, S. et al. Anti-infective potential of Citrus bergamia Risso et Poiteau (bergamot) derivatives : a systematic review. **Phytotherapy Research**, [s. l.], n. March, 2016.
- CORASANITI, M. T. et al. Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 151, p. 518–529, 2007.
- DARVEAU, R. P. Porphyromonas gingivalis neutrophil manipulation: risk factor for periodontitis? **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 428–429, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.06.006>>
- DI BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, [s. l.], v. 2013, n. 503754, p. 1–7, 2013.
- DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological activities and safety of citrus spp. essential oils. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 19, n. 1966, p. 1–25, 2018.
- DUARTE, P. M. et al. Alendronate may protect against increased periodontitis - related bone loss in estrogen-deficient rats. **J Periodontol**, [s. l.], v. 75, n. 9, p. 1196–1202, 2004.
- FERLAZZO, N. et al. Anti-inflammatory activity of Citrus bergamia derivatives : where do we stand ? **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 1273, p. 1–11, 2016.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 33, p. 829–837, 2012.

FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-1905-5>>

GALVÃO, M. P. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 56–62, 2003.

GRAZIANI, F. et al. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 152–188, 2017.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 27, p. 409–419, 2012.

HEITZ-MAYFIELD, L. J. A.; LANG, N. P. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 62, p. 218–231, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5301/jabfm.5000215>><<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210404008145>>

HUANG, G. T. J. et al. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: Multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 1364–1372, 2001.

IMPELLIZZERI, D. et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 34, p. 1146–1154, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2014.11.012>>

JI, S. et al. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. **Journal of Periodontal Research**, [s. l.], v. 42, p. 503–510, 2007.

JIN, Q. et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone Loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 1300–1308, 2007.

KARACA, M. et al. Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. **Eur J Gen Med**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 176–179, 2007.

KHODABAKHSH, P.; SHAFAROODI, H.; ASGARPANAH, J. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus aurantium* L. blossoms essential oil (neroli): Involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. **J Nat Med**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 324–331, 2015.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews**, [s. l.], v. 3, n. 17038, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>>

KIRKWOOD, K. L. et al. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. **Periodontology** 2000, [s. l.], v. 43, p. 294–315, 2007.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology** 2000, [s. l.], v. 14, p. 33–53, 1997.

KUWAHATA, H. et al. Peripherally injected linalool and bergamot essential oil attenuate mechanical allodynia via inhibiting spinal ERK phosphorylation. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 103, p. 735–741, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.11.003>>

LAPPIN, D. F. et al. Inducible nitric oxide synthase expression expression in periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 369–373, 2000.

LEITÃO, R. F. C. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 956–963, 2005.

LOHINAI, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 123, p. 353–360, 1998.

LOMBARDO, G. E. et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of bergamot essential oil and its antinociceptive effects. **Plants**, [s. l.], v. 9, n. 704, p. 1–17, 2020.

MENEZES, A. M. A. et al. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, [s. l.], v. 76, n. 11, p. 1901–1909, 2005.

NAVARRA, M. et al. Citrus bergamia essential oil : from basic research to clinical application. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 6, p. 1–7, 2015.

NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 38, n. SUPPL. 11, p. 49–59, 2011.

PAPAPANOU, P. N. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 45, n. December 2017, p. S162–S170, 2018.

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 9, p. 721–726, 2002.

PERNA, S. et al. Efficacy of bergamot: From anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms to clinical applications as preventive agent for cardiovascular morbidity, skin diseases, and mood alterations. **Food Sci Nutr**, [s. l.], v. 7, p. 369–384, 2019.

PLASTINA, P. et al. In vitro anti-inflammatory and radical scavenging properties of chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) essential oils. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 783, p. 1–13, 2018.

PRESHAW, P. M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 0, p. 1–19, 2017.

RAI, V. K. et al. **Anti-psoriatic effect of *Lavandula angustifolia* essential oil and its major components linalool and linalyl acetate**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2020. v. 113127 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113127>>

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J Periodont Res**, [s. l.], v. 1, p. 193–203, 1966.

SAKALLIOĞLU, E. E. et al. Gingival levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in diabetes mellitus and periodontitis: An experimental study in rats. **Clinical Oral Investigations**, [s. l.], v. 12, p. 83–89, 2008.

SAKURADA, T. et al. Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. **International review of neurobiology**, [s. l.], v. 85, v. 1, p. 237–248, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85018-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85018-6)>

SCUTERI, D. et al. Neuropharmacology of the neuropsychiatric symptoms of dementia and role of pain: essential oil of bergamot as a novel therapeutic approach. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.],

v. 20, n. 3327, p. 1–13, 2019.

UĞAR-ÇANKAL, D.; OZMERIC, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 366, p. 90–100, 2006.

WU, Y. H. et al. Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature-induced experimental periodontitis. **Odontology**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 339–349, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10266-019-00471-1>>

YILMAZ, Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. **Microbiology**, [s. l.], v. 154, p. 2897–2903, 2008.

ANEXO A - Parecer do Comitê Ético em Pesquisa de Animais

O óleo essencial de bergamota (BEO) tem sido investigado por suas atividades anti-inflamatórias e analgésicas (Navarra et al., 2015; Impellizzeri et al., 2015) sendo demonstradas por Karaca et al. 2007 em teste de edema de pata induzido por carragenina, onde encontraram redução na inflamação em 95,70% com indometacina (controle padrão), 27,56% com 0,025 mL / kg de BEO, 30,77% com 0,05 mL / kg de BEO e 63,39% com 0,10 mL / kg de BEO.

Ainda não existem estudos avaliando um potencial efeito do extrato hidroalcoólico da *A. Brachypoda* ou do óleo essencial de bergamota em modelos de doença periodontal, entretanto, resultados de análises preliminares *in vitro* do nosso grupo de pesquisa revelaram tanto uma ação anti-inflamatória do extrato bruto das folhas da *A.brachypoda* quanto do óleo essencial de bergamota, com redução de IL1- β e óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (dados não publicados).

Para essa pesquisa serão selecionados 32 animais com idade de, aproximadamente, 3 meses e peso entre 250 e 350 g, os quais serão distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos (n= 8 animais/grupo):

Os animais serão, aleatoriamente, divididos em 4 grupos:

1) Grupo Controle (n=8 animais): Ratos sem ligadura que receberão gavagem diária com veículo (DMSO 2%);

2) Grupo ligadura (n= 8 animais): Ratos com ligadura que receberão gavagem diária com veículo;

3) Grupo ligadura + extrato hidroalcoólico de *A. brachypoda* (n= 8 animais): Ratos com ligadura que receberão gavagem diária com o extrato hidroalcoólico de *A. brachypoda* 50 mg/kg em veículo (dose baseada nos resultados preliminares *in vitro*).

4) Grupo ligadura + BEO (n=8 animais): ratos com ligadura que receberão gavagem diária com óleo essencial de bergamota (0,1 mL/kg). O BEO será adquirido comercialmente (Sigma®), e sua concentração a ser testada foi definida com base em suas ações anti-inflamatórias descritas, anteriormente, na literatura (Berliocchi et al., 2009; Bagetta et al., 2010).

O óleo essencial de bergamota (BEO) tem sido investigado por suas atividades anti-inflamatórias e analgésicas (Navarra et al., 2015; Impellizzeri et al., 2015) sendo demonstradas por Karaca et al. 2007 em teste de edema de pata induzido por carragenina, onde encontraram redução na inflamação em 95,70% com indometacina (controle padrão), 27,56% com 0,025 mL / kg de BEO, 30,77% com 0,05 mL / kg de BEO e 63,39% com 0,10 mL / kg de BEO.

Ainda não existem estudos avaliando um potencial efeito do extrato hidroalcoólico da *A. Brachypoda* ou do óleo essencial de bergamota em modelos de doença periodontal, entretanto, resultados de análises preliminares *in vitro* do nosso grupo de pesquisa revelaram tanto uma ação anti-inflamatória do extrato bruto das folhas da *A.brachypoda* quanto do óleo essencial de bergamota, com redução de IL1- β e óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (dados não publicados).

Para essa pesquisa serão selecionados 32 animais com idade de, aproximadamente, 3 meses e peso entre 250 e 350 g, os quais serão distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos (n= 8 animais/grupo):

Os animais serão, aleatoriamente, divididos em 4 grupos:

- 1) Grupo Controle (n=8 animais): Ratos sem ligadura que receberão gavagem diária com veículo (DMSO 2%);
- 2) Grupo ligadura (n= 8 animais): Ratos com ligadura que receberão gavagem diária com veículo;
- 3) Grupo ligadura + extrato hidroalcoólico de *A. brachypoda* (n= 8 animais): Ratos com ligadura que receberão gavagem diária com o extrato hidroalcoólico de *A. brachypoda* 50 mg/kg em veículo (dose baseada nos resultados preliminares *in vitro*).
- 4) Grupo ligadura + BEO (n=8 animais): ratos com ligadura que receberão gavagem diária com óleo essencial de bergamota (0,1 mL/kg). O BEO será adquirido comercialmente (Sigma®), e sua concentração a ser testada foi definida com base em suas ações anti-inflamatórias descritas, anteriormente, na literatura (Berliocchi et al., 2009; Bagetta et al., 2010).



REFERÊNCIAS

BAGETTA, G.; MORRONE, L. A.; ROMBOLÀ, L.; AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BERLIOCCHI, L. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*. 2010;81(6):453-61.

BERLIOCCHI L.; RUSSO R.; LEVATO A.; FRATTO V.; BAGETTA G.; SAKURADA S. et al. (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in C57/BL6 mice. *Int Rev Neurobiol*. 2009; 85:221-35.

FREIRES, I. A. et al. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. *Archives of Oral Biology*, v. 87, p. 196–203, 2018.

FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L. How Natural Product Research has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View. *Pharmaceutical Research*, v. 33, n. 6, p. 1311–1317, 2016.

IMPELLIZZERI, D.; BRUSCHETTA, G.; DI PAOLA, R.; AHMAD, A.; CAMPOLO, M.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, E.; NAVARRA, M. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin. Nutr*. 2015, 34, 1146–1154.

KARACA, M.; ÖZBEK, H.; HIM, A.; TÛTÛNCÛ, M.; AKKAN, H.A.; KAPLANOGLU, V. Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. *Eur. J. Gen. Med*. 2007, 4, 176–179.

NAVARRA, M.; MANNUCCI, C.; DELBO, M.; CALAPAI, G. Citrus bergamia essential oil: From basic research to clinical application. *Front. Pharmacol*. 2015, 6, 36.

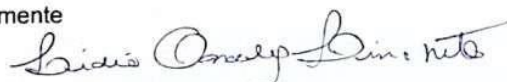
Pesquisador responsável:

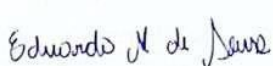
Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto

Colaboradores:

Luciana Salles Branco de Almeida, Luciana Maia Moura Naves, Cláudia Quintino da Rocha, Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz, Amanda Pereira Moreira e Lucas Daylor Aguiar da Silva.

Atenciosamente



Aprovado,

 Eduardo M de Jesus



**CEUMA – UNIVERSIDADE Reitoria
Gerências de Graduação e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA UNICEUMA**

DECISÃO DA CEUA – UNICEUMA SOBRE PROTOCOLO SUBMETIDO

DATA DO RECEBIMENTO: 21/06/2019

Nº DO PROTOCOLO: 110/19

Nº DO PARECER: 09/19

DATA DO PARECER: 19/09/19

*Recebido
30/10/19
SL*

TÍTULO DO PROJETO/AULA: Avaliação da atividade anti-inflamatória da *Arrabidaea brachypoda* em modelo animal de periodontite

CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA: 18 Ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, linhagem Wistar, com 4 a 9 semanas de vida.

PESQUISADOR/PROFESSOR RESPONSÁVEL: Lídio Gonçalves Lima Neto

COLABORADORES: Luciana Salles Branco de Almeida, Luciana Maia Moura Naves, Cláudia Quintino da Rocha e Lucas Daylor Aguiar da Silva.

DECISÃO: (X) APROVADO () PENDENTE () EXCLUÍDO () NÃO APROVADO

A CEUA-UNICEUMA, em sua função de examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na Instituição, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável (Lei. 11794 e Resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA). Reuniu-se no dia 20/09/2019, para apreciar a análise do relator da proposta de protocolo nº 110/19, tendo chegado por votação da maioria dos membros presentes, as seguintes considerações:

Considerações: O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau em modelo de doença periodontal (DP) induzida por ligaduras em ratos. O delineamento experimental do presente projeto consta de 18 ratos Ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, linhagem Wistar, com 4-9 semanas de vida. 56 camundongos isogênicos (machos), linhagem C57BL/6, peso 20 – 25 g, adultos, 8-10 semanas de vida, oriundos do Biotério de Criação e Experimentação Animal do UNICEUMA. Os animais serão distribuídos em 3 grupos experimentais (Controle; ratos sem ligaduras que receberão gavagem diária com veículo DMSO 2%; Ligadura: ratos com ligaduras que receberão gavagem diária com o veículo; Ligadura + extrato hidroalcoólico *A. brachypoda*, ratos com ligadura que receberão gavagem com o extrato hidroalcoólico *A. brachypoda* 50 mg/kg em veículo), contendo em cada grupo 06 animais. O projeto foi delineado no período experimental de 14 dias para tratamentos, com subsequente avaliação dos animais e eutanásia. Os animais serão tratados por gavagem 1x ao dia durante 14 dias. Será realizado neste período coleta diária de fezes. Após os tempos de tratamento, os animais serão submetidos a eutanásia com uso prévio de anestésico (Ketamania 90 mg/Kg)

associado ao relaxante muscular (Xilanzina 10 mg/Kg). Em seguida, serão coletados: os tecidos gengivais, fígado e rins, com a amostra sendo utilizada para avaliação de expressão gênica de IL-1 β , IL-17 e iNOS nos tecidos gengivais, mensuração da produção de NO, mensuração da reabsorção óssea alveolar e avaliação histopatológica do fígado e dos rins.

Itens a serem revisados:

- 2- Item 9.4.2.7 Avaliação do fígado e dos rins:** No referido projeto o tempo para fixação com a solução de formaldeído 10% dos determinados órgãos são de 7 dias. O tempo de acordo com o manual da Fiocruz é de 24 a 48 horas.
- 3- Item 9.6 Condições de alojamento e alimentação dos animais:** São 6 animais por grupos. Serão colocados 4 animais por gaiola. Os demais animais, no caso 2, podem ficar em uma única gaiola, ao invés de gaiolas individuais.
- 4- Item 10.2 Uso de fármacos anestésicos:** A via de administração do anestésico é intramuscular, porém no item 9.4.2.2.1 a via descrita é a intraperitoneal.

Conclusão: Aprovado

Com base nos dados fornecidos pelo proponente, a Comissão, autoriza o protocolo supracitado, devendo o presente documento ser apresentado a Coordenação do Biotério, para agendamento do início dos procedimentos.

* Cópia do protocolo segue anexa.

São Luís/MA, 20/09/2019

Lidio Gonçalves Lima Neto
Coordenador CEUA-UNICEUMA


Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto
Coord. Comissão de Ética no Uso
de Animais - CEUA
Universidade Ceuma

ANEXO B - Normas do Periódico Journal of Periodontal Research

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations and symbols: Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g.

streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps* .for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating 'Both the authors have contributed equally to the work'. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract: The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Main Text of Original Research Articles

Introduction: Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods: Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion: Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in superscript format. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as **Reference Manager** for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://refman.com/downloads/styles>

Examples:

(1) *Standard* *journal* *article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate* *author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No* *author* *given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal* *supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt

- 2): 316- 324.
 Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.
- (5) *Journal* paginated by issue
 Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.
- (6) *Personal* author(s)
 Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*, 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.
- (7) *Editor, compiler, chairman as author*
 Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.
- (8) *Chapter in a book*
 Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.
- (9) *Published proceedings paper*
 DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.
- (10) *Agency publication*
 Ranofsky AL. *Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975*. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)
- (11) *Dissertation or thesis*
 Cairns RB. *Infrared spectroscopic studies of solid oxygen*. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs

should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 periodontitei (halftone) or 600 to 1200 periodontitei (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 periodontitei; half-tones (including gel photographs): >300 periodontitei; figures containing both halftone and line images: >600 periodontitei.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

Supporting Material

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.