



# **EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM OS COMPOSTOS NEOVESTITOL E VESTITOL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS GENGIVAIS DE RATOS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR LIGADURA**

**Palavras-Chave: PRÓPOLIS VERMELHA, PERIODONTITE, EXPRESSÃO GÊNICA**

**Autores(as):**

**YASMIN SAMARA SANTOS, FOP – UNICAMP**

**LARISSA MATIAS MALVAZI (co-orientadora), FOP – UNICAMP**

**Prof. Dr. BRUNO BUENO SILVA (orientador), FOP – UNICAMP**

## **INTRODUÇÃO:**

A doença periodontal pode ser definida como uma doença multifatorial inflamatória associada ao acúmulo de biofilme dental disbiótico e é caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte dental. Além disso, observa-se uma interação complexa entre comunidades bacterianas, respostas imunes destrutivas do hospedeiro e fatores ambientais (Kwon et al., 2021). A remoção mecânica do biofilme, por meio da raspagem e alisamento radicular, é a principal etapa do tratamento da periodontite, entretanto, muitas vezes não é suficiente, sendo necessário utilizar estratégias complementares, através da administração de antimicrobianos sistêmicos ou de enxaguatórios bucais (Khattri, et al., 2020).

Os efeitos dos antibióticos sistêmicos para o tratamento da doença periodontal foram bastante estudados, demonstrando melhora nos parâmetros clínicos da periodontite (Feres et al., 2015). Entretanto, algumas características desse tipo de medicamento geram dúvidas quanto a sua prescrição, sendo observado que estes podem não estar presentes em concentrações suficientes nas bolsas periodontais, além de expor os indivíduos ao risco do desenvolvimento de resistência bacteriana, reações alérgicas e serem esperadas alterações na composição microbiana de outros sistemas do organismo por seu espectro amplo e uso prolongado, cujas consequências a longo prazo não estão bem elucidadas (Khattri, et al., 2020).

Sendo assim, a descoberta de novas drogas a partir de produtos naturais tem despertado considerável interesse na comunidade científica, tendo em vista que fármacos como o metronidazol, usados como coadjuvantes no tratamento da periodontite, apresentam inúmeros efeitos colaterais e interações com organismo do hospedeiro. O extrato bruto da própolis vermelha brasileira (PVB), cujos compostos principais são o neovestitol e o vestitol, é um exemplo de substância proveniente de fontes naturais que vem sendo amplamente estudada (Bueno-Silva, et al., 2013b).

A própolis brasileira é um produto natural produzido pelas abelhas *Apis mellifera*, que apresenta propriedades biológicas e farmacêuticas, como atividades antimicrobiana, antibiofilme, antioxidante e anti-inflamatória (Bueno-Silva, et al., 2017). Esta própolis possui coloração vermelha intensa e seus principais constituintes são os isoflavonóides e flavonóides, destacando-se a formononetina, vestitol e neovestitol (Bueno-Silva et al., 2015). O vestitol e o neovestitol apresentam propriedades antimicrobiana e anti-inflamatória, assim, podem ser considerados uma boa opção como agentes bioativos bucais (Bueno-Silva et al., 2013a; Macedo et al., 2024).

## METODOLOGIA:

A doença periodontal experimental foi desenvolvida de acordo com Branco-de-Almeida et al., 2020 e de Oliveira et al., 2023 com algumas modificações. Células de *Porphyromonas gingivalis* W83 ( $1 \times 10^9$  UFC) ressuspensas em gel de carboximetilcelulose a 2% foram inoculadas, por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem, em 5 dias consecutivos, duas vezes por dia por exatos 5 dias prévios ao início do experimento. Também foi realizada a colocação de ligaduras, que foi mantida até o final do período experimental, dia 15. A indução foi realizada bilateralmente, no primeiro molar mandibular de cada animal pela colocação de ligadura de algodão (Corrente Algodão nº 10; Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil), em uma posição cervical, amarrado submarginalmente, sendo que sua presença foi confirmada no sétimo dia do período experimental.

A colocação da ligadura foi realizada sob anestesia, respeitando-se todas as normas éticas para manuseio dos animais. Ao longo de todo o modelo, foi realizado acompanhamento do peso, alterações na mobilidade, perda de pelos ou presença de lesões cutâneas decorrentes da infecção. Os animais utilizados foram ratos wistar como descrito em Branco-de-Almeida et al., 2020 e de Oliveira et al., 2023 com adaptação da inoculação de *P. gingivalis* como descrito acima.

Os grupos de tratamento foram:

Grupo I - CNV - com ligadura e tratados via oral com a CNV à 20 mg/kg de peso;

Grupo II - METRO - com ligadura e tratados via oral com metronidazol à 100mg/Kg;

Grupo III - LIG - com ligadura e tratado com veículo controle;

Cada grupo contou com 6 animais e os tratamentos foram realizados diariamente, 1 vez por dia, por 14 dias a partir do dia seguinte da colocação da ligadura. Após 15 dias da última inoculação dos patógenos, após 5 horas de jejum, os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina (Dopalen 10%- Laboratório Vertbrands – Brasil) e xilazina (Ansedan 2%- Laboratório Vertbrands-Brasil) e então foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Os tecidos gengivais circundantes ao primeiro molar mandibular foram coletados e acondicionados em uma solução para evitar a degradação do RNA (RNAlater®, Ambion Inc., Austin, TX, EUA). A extração de RNA das células foi realizada através do Kit de extração de RNA (Qiagen Rneasy – cat 74104). A concentração, qualidade e pureza do RNA isolado foram estabelecidas usando um Nano DropOne/Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O RNA de cada amostra foi convertido em cDNA usando SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Para a transcrição reversa, as condições foram de 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. Os níveis de expressão relativa foram avaliados por transcrição reversa seguido de PCR quantitativo (qPCR), usando 200ng de cDNA em um sistema de expressão de gene TaqMan (Applied Biosciences, Foster City, CA, Estados Unidos), com iniciadores e sondas TaqMan para *Calml* (Rn00821407\_g1), relacionado a síntese de óxido nítrico; *Birc3* (Rn00576911\_m1), *Egr1* (Rn00561138\_m1), *Egfr* (Rn01434447\_m1), relacionados a via do NF-κB; *Capns1* (Rn01498486\_g1) e *Illb* (Hs01555410\_m1), relacionados a interleucina IL-1B; *Icam1* (Rn00564227\_m1), relacionado a transmigração de leucócitos; *Mmp7* (Rn00689241\_m1) e *Wnt5a* (Rn01402000\_m1), genes relacionados a destruição tecidual e aumento na resposta inflamatória durante a doença periodontal e *Gapdh* (Rn01775763\_g1). Todos estes genes foram escolhidos de acordo com resultados prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Bueno-Silva et al., 2015, 2017). Além disso, também foram avaliados os seguintes genes: *Tnfrsf11a* (Rank), *Bmp2*, *Nfatc1*, *Runx2*, *Irf8*, relacionados ao metabolismo ósseo.

O qPCR constitui-se de uma etapa inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 s e 50°C por 1 min, utilizando o LightCycler 480 II (Roche). Todos os dados serão

normalizados para níveis de transcritos de *Gapdh* (controle endógeno) no mesmo conjunto de cDNA e análise de expressão relativa realizada pelo método  $\mu$ CT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A figura 2 mostra os resultados da expressão gênica de *Birc3*, *Calm1*, *Icam*, *Irf-8*, *Runx2*, *Nfatc-1*, *Egr1*, *Bmp2*, *Mmp7*, *Tnfrsf11a* (Rank), *Egfr*, *Wnt5a* e *Capns1*. O Tratamento com CNV-VO aumentou a expressão de *Mmp7*, *Tnfrsf11a* (Rank), *Wnt5a* e *Bmp2* em relação à LIG ( $p < 0,05$ ).

O grupo tratado com CNV na dose de 20mg/kg de peso (CNV-VO) mostrou um aumento significativo na expressão do gene da proteína morfogenética óssea-2 (*Bmp2*) em comparação com os grupos controle LIG e METRO ( $P < 0,05$ ).

*Bmp2* desempenha um papel crucial na estimulação da síntese da matriz óssea e na diferenciação dos osteoblastos, fundamentais para o processo de formação e manutenção óssea. Ela promove a síntese dos componentes essenciais da matriz óssea, contribuindo assim para a estrutura e resistência óssea adequadas (Zuvairiya, et al., 2024). Assim, o aumento da expressão gênica de *Bmp2* provocado pelo tratamento com CNV pode ser considerado um efeito positivo no controle da perda óssea normalmente encontrada nas periodontites.

Por outro lado, o tratamento com CNV aumentou a expressão de *Tnfrsf11a* (Rank). O processo de osteoclastogênese é diretamente controlado pelo receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) nos osteoclastos, bem como pela regulação positiva de RANKL, uma proteína expressa principalmente na superfície dos osteoblastos e células estromais da medula óssea. RANKL é secretado por várias fontes, incluindo osteoblastos, células estromais da medula óssea e linfócitos ativados, e interage com o receptor RANK nos precursores dos osteoclastos. Esse mecanismo estimula a diferenciação dessas células em osteoclastos maduros, promovendo a reabsorção óssea e, conseqüentemente, a degradação do tecido ósseo. O desequilíbrio no sistema RANK/RANKL/OPG é

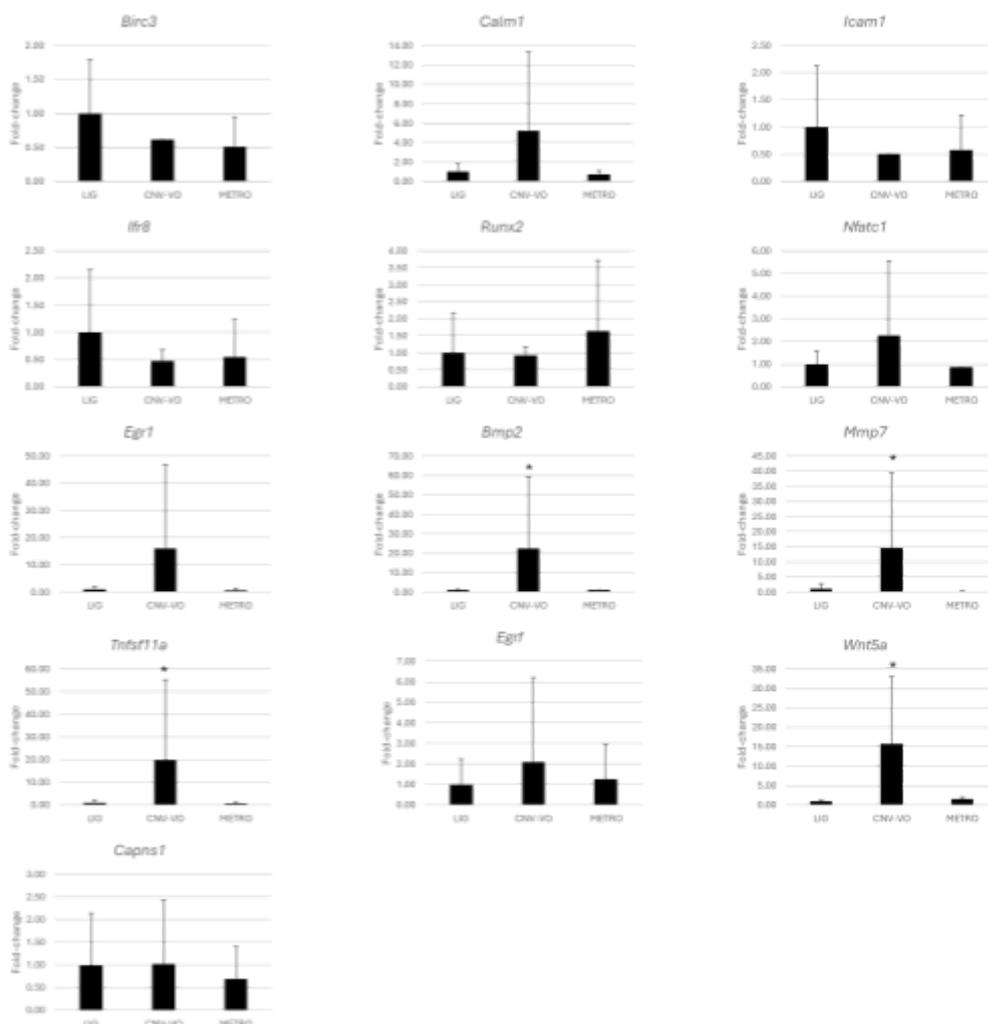


Figura 1: Média e desvio padrão da expressão gênica de *Birc3*, *Calm1*, *Icam*, *Irf-8*, *Runx2*, *Nfatc-1*, *Egr1*, *Bmp2*, *Mmp7*, *Tnfrsf11a* (Rank), *Egfr*, *Wnt5a* e *Capns1* dos animais com ligadura sem tratamento (LIG) e tratados com a combinação neovestitol e vestitol na dose de 20 mg/Kg de peso (CNV-VO) e com metronidazol a 100 mg/Kg (METRO). "\*" significa diferença estatisticamente significativa por meio de análise estatística com Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

considerado um dos principais fatores patogênicos responsáveis pela perda óssea (Zhao et al., 2009; Martin et al., 2015; Kitaura et al., 2020; Liu et al., 2023).

Além disso, observou-se um aumento na expressão do gene *Mmp7* comparado ao grupo LIG ( $P < 0,05$ ). *Mmp7* está associada à inflamação e destruição observada na periodontite, influenciando a produção, diferenciação, migração e adesão de neutrófilos (Swee, et al., 2008; Zhan, et al., 2023).

*Wnt-5a* desempenha um papel crucial na indução de um fenótipo inflamatório, regulando positivamente genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e ativando vias pró-inflamatórias. Sua expressão aumentada está associada a várias doenças inflamatórias, como aterosclerose, artrite reumatoide, doença periodontal e periodontite apical crônica, destacando seu potencial na regulação da inflamação. Além disso, *Wnt-5a* influencia a diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea, participando ativamente das respostas inflamatórias mediadas pela imunidade inata e adaptativa através da via NF- $\kappa$ B (Chatzopoulos, et al., 2019; Chatzopoulos, et al., 2021). O aumento na expressão de *Wnt5a* provocado pelo tratamento com a CNV pode ser um indicativo de que não está havendo resolução da inflamação dos tecidos. Por outro lado, existem outras vias inflamatórias que podem ser afetadas pela CNV e que não foram avaliadas no presente trabalho, como por exemplo, a via dos receptores Toll-like. Estudos prévios *in vitro* indicaram ação da CNV nos receptores do tipo Toll e a via do NF- $\kappa$ B.

O estudo conduzido por Macedo et al. (2024) demonstra que os compostos vestitol e neovestitol apresentaram propriedades antimicrobianas em testes *in vitro*. Esses compostos foram eficazes na redução de várias espécies bacterianas em modelos de biofilme multiespécies associados à doença periodontal. A CNV promoveu a diminuição da concentração das principais bactérias associadas à doença periodontal, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*. Além disso, observou-se uma redução nas espécies dos gêneros *Fusobacterium*, que são importantes na transição da saúde periodontal para a doença (Macedo et al., 2024).

O controle positivo utilizado neste experimento foi o metronidazol, antibacteriano comumente utilizado no tratamento das doenças periodontais. A hipótese para a escolha deste controle é que com a redução da microbiota promovida pelo uso do antimicrobiano padrão, esperava-se também uma redução da inflamação nos tecidos, o que por meio das presentes análises, não pode ser observado. No entanto, é importante ressaltar que a grande maioria dos estudos *in vivo* com modelo de ligadura não utiliza nenhum controle positivo.

## CONCLUSÕES:

Conclui-se que o tratamento sistêmico com CNV promoveu um aumento significativo na expressão do gene *Bmp 2*, sugerindo um efeito positivo na formação da matriz óssea durante a doença periodontal. Por outro lado, o aumento na expressão dos genes *Mmp7* e *Wnt-5a* indica uma possível resposta inflamatória tecidual persistente. A ausência de redução nos valores dos genes pró-inflamatórios com CNV sugere que seu efeito benéfico na doença periodontal pode estar relacionada a sua ação antimicrobiana e ao aumento do *Bmp2*. Devido à complexidade da doença periodontal, são necessários mais estudos para compreender completamente os efeitos da CNV sobre diferentes mecanismos envolvidos na doença periodontal.

## BIBLIOGRAFIA

BRANCO-DE-ALMEIDA, Luciana S.; FRANCO, Gilson C. N.; CASTRO, Myrella L.; VIEIRA, Mayana S.; GALVÃO-MOREIRA, Leonardo V.; CORTELLI, Sheila C. et al. Protective effects of desipramine on alveolar bone in experimental periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 91, n. 12, p. 1694–1703, 2020.

BUENO-SILVA, Bruno; ALENCAR, Severino M.; ROSALEN, Pedro L.; ANDO-SUGUIMOTO, Ellen S.; MAYER, Marcia P. A. Atividade antimicrobiana e antiinflamatória da combinação Neovestitol-Vestitol, obtida da própolis vermelha. **Braz Oral Res**, 2013a; 27(suppl 1):48.

BUENO-SILVA, Bruno; KOO, H; FALSETTA, Megan L.; ALENCAR, Severino M.; IKEGAKI, Masaharu; ROSALEN, Pedro L. Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm *in vitro* and development of dental caries *in vivo*. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233–1242, 2013b.

BUENO-SILVA, Bruno; KAWAMOTO, Diane; ANDO-SUGUIMOTO, Ellen S.; ALENCAR, Severino M.; ROSALEN, Pedro L.; MAYER, Marcia P. A. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144954, 2015.

BUENO-SILVA, Bruno; ROSALEN, Pedro L.; ALENCAR, Severino M.; MAYER, Marcia P. A.. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. **J Func Foods**, v. 36, p. 440-447, 2017.

CHATZOPOULOS, Georgios S.; MANSKY, Kim C.; LUNOS, Scott; COSTALONGA, Massimo; WOLFF, Larry F. Sclerostin and WNT-5a gingival protein levels in chronic periodontitis and health. **Journal of Periodontal Research**, v. 54, n. 5, p. 555–565, 2019.

CHATZOPOULOS, Georgios S.; COSTALONGA, Massimo; MANSKY, Kim C.; WOLFF, Larry F. WNT-5a and SOST levels in gingival crevicular fluid depend on the inflammatory and osteoclastogenic activities of periodontal tissues. **Medicina (Kaunas)**, v. 57, n. 8, p. 788, 2021.

DE OLIVEIRA, Izabel C. V.; GALVÃO-MOREIRA, Leonardo V.; VILELA, Juliana L., DUARTE-SILVA Murillo; AGUIAR-DA-SILVA, Lucas D.; PEREIRA, Cesar A. A. et al. Cinnamaldehyde modulates host immunoinflammatory responses in rat ligature-induced periodontitis and peripheral blood mononuclear cell models. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109669, 2023.

FERES, Magda; FIGUEIREDO, Luciene C.; SOARES, Geisla M. Silva; FAVERI, Marcelo. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 67, n. 1, p. 131–186, 2015.

KHATTRI, Shivi; NAGRAJ, Sumanth Kumbargere; ARORA, Ankita; EACHEMPATI, Prashanti; KUSUM, Chandan Kumar; BHAT, Kishore. Adjunctive systemic antimicrobials for the non-surgical treatment of periodontitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.11, 2020.

KITAURA, Hideki; MARAHLEH, Aseel; OHORI, Fumitoshi; NOGUCHI, Takahiro; SHEN, Wei-Ren; QI, Jiawei et al. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 5169, 2020.

KWON, TaeHyun; LAMSTER, Ira B.; LEVIN, Liran. Current Concepts in the Management of Periodontitis. **International Dental Journal**, v. 71, n. 6, 2020.

LIU, Chun-Liu; HO, Trung-Loc; FANG, Shuen-Yih; GUO, Jeng-Hung; WU, Chih-Ying; FONG, Yi-Chin et al. Ugonin L inhibits osteoclast formation and promotes osteoclast apoptosis by inhibiting the MAPK and NF-κB pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, n. 115392, p. 115392, 2023.

MACEDO, Tatiane T.; MALAVAZI, Larissa M.; VARGAS, Gustavo Q.; GONÇALVES, Francisco J. S.; GOMES, A. P. A. P.; BUENO, Manuela R. et al. Combination of Neovestitol and Vestitol Modifies the Profile of Periodontitis-Related Subgingival Multispecies Biofilm. **Biomedicines**, v. 12, n. 6, p. 1189, 2024.

MARTIN, Anthony, XIONG, Jian; KOROMILA, Theodora; JI, Jie S; CHANG, Stephanie; SONG, Yae S. et al. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. **Bone**, v. 75, p. 96–104, 2015.

SWEE, Mei; WILSON, Carole L; WANG, Ying; MCGUIRE, John K; PARKS, William C. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 6, p. 1404–1412, 2008.

ZHAN, Chi; ZHOU, Zhaocai; HUANG, Yaxian; HUANG, Shuheng; LIN, Zhengmei; HE, Feng et al. Exploration of the shared gene signatures and molecular mechanisms between periodontitis and inflammatory bowel disease: evidence from transcriptome data. **Gastroenterology Report**, v. 11, 2023.

ZHAO, Baohong; TAKAMI, Masamichi; YAMADA, Atsushi; WANG, Xiaogu; KOGA, Takako; HU, Xiaoyu et. al. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1066–1071, 2009.

ZUVAIRIYA, Ummu; PRIYADHARSHINI, R; PALATI, Sinduja. Evaluation of *Cardiospermum halicacabum* on Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2) mRNA Expression in Osteoblast Cells. **Cureus**, v. 16, n. 5, p. e60292, 2024.