

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

**Palavras-Chave:** Doença periodontal; Própolis vermelha brasileira; Neovestitol e Vestitol; PCR real-time

**Autores(as):**

**NATHÁLIA ROHWEDDER DOS SANTOS, FOP - UNICAMP**  
**LARISSA MATIAS MALVAZI (co-orientadora), FOP - UNICAMP**  
**Prof. Dr. BRUNO BUENO-SILVA (orientador), FOP - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica induzida por um biofilme disbiótico, que compromete os tecidos de suporte dentário (Abdulkareem et al., 2023; Papapanou et al., 2018). O desequilíbrio entre a microbiota e a resposta imune do hospedeiro leva à ativação de vias inflamatórias e à reabsorção óssea, principalmente por meio do sistema RANK/RANKL/OPG (Zhou et al., 2022; Zhao et al., 2009). Citocinas pró-inflamatórias e mediadores como Óxido Nítrico e Prostaglandina E2, produzidos por osteócitos e macrófagos, intensificam os danos teciduais (Kitaura et al., 2020; De Oliveira et al., 2023).

Embora o tratamento convencional envolva raspagem e uso de antimicrobianos como a clorexidina, efeitos adversos limitam seu uso prolongado (Almhöjd et al., 2023; Zhao et al., 2020). Nesse cenário, compostos naturais como o vestitol e o neovestitol, presentes na própolis vermelha brasileira (PVB), têm se mostrado eficazes por suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (Bueno-Silva et al., 2013; Bueno-Silva et al., 2017; Bueno-Silva et al., 2020; De Figueiredo et al., 2020).

A formulação CNV, contendo esses compostos e veiculada em poloxâmero 407 (PL-407), demonstrou, em testes in vitro, efeitos comparáveis à clorexidina na redução do biofilme e modulação da microbiota (Bueno-Silva et al., 2022; Akkari et al., 2016). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento tópico com CNV sobre a expressão gênica em tecidos gengivais de ratos com periodontite induzida por ligadura.

## METODOLOGIA:

Este estudo avaliou os efeitos terapêuticos da formulação CNV, contendo compostos bioativos da própolis vermelha brasileira veiculados em poloxâmero 407 (PL-407), sobre a expressão gênica de mediadores inflamatórios e do metabolismo ósseo em um modelo experimental de periodontite em ratos Wistar. A doença foi induzida por inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis* W83 e pela colocação de ligaduras subgingivais no 1º molar mandibular, conforme modelo validado na literatura (Figura 1 - Branco-de-Almeida *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2023). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Guarulhos (CEUA - Protocolo número: 060/23 ) e seguiram as diretrizes do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, 1996)

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=6):

Grupo I – LIG (controle com ligadura): tratado com veículo;

Grupo II – CNV: tratado topicamente com CNV (1600 µg/mL) formulado em PL-407;

Grupo III – CHX: tratado com digluconato de clorexidina 0,12%;

Os tratamentos tópicos foram aplicados uma vez ao dia por 14 dias, iniciando-se 24 horas após a colocação da ligadura. No 15º dia, os animais foram anestesiados para coleta de saliva e posteriormente eutanasiados respeitando todas as normas éticas para manuseio de animais.

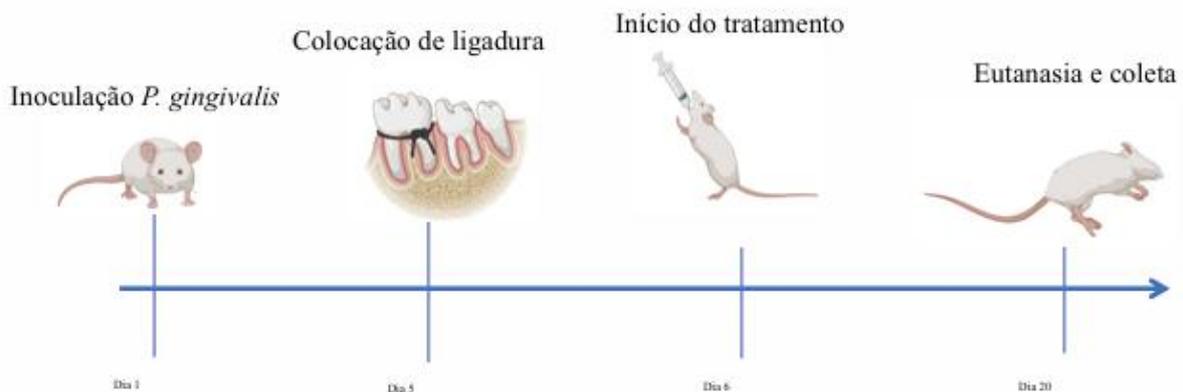


Figura 1: Cronograma esquemático do protocolo experimental de periodontite em ratos wistar

Para a análise molecular, tecidos gengivais ao redor do 1º molar mandibular foram coletados e preservados em RNAlater® para extração de RNA (Qiagen RNeasy®) (De Oliveira *et al.*, 2023). A qualidade, pureza e concentração do RNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDropOne), seguido da síntese de cDNA (Figura 2) com o sistema SuperScript VIL0 MasterMix (De Oliveira *et al.*, 2023). A expressão gênica relativa foi quantificada por qPCR (Figura 3), utilizando sondas TaqMan® (Papathanasiou *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2023).



Figura 2: Fluxograma do processamento de tecido gengival para análise de expressão gênica

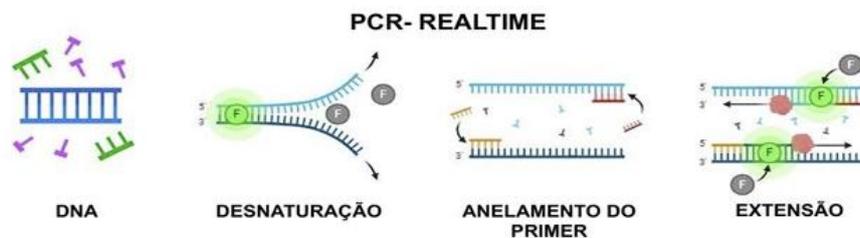


Figura 3: Etapas do PCR em Tempo Real (qPCR - quantitative polymerase chain reaction)

Foram analisados genes associados à inflamação (*Calm1*, *Il1b*, *Icam1*, *Socs3*, *Mmp7*, *Wnt5a*), à via do NF- $\kappa$ B (*Birc3*, *Dab2*, *Egr1*, *Egfr*), ao metabolismo ósseo (*Tnfrsf11a/RANK*, *Tnfrsf11b/OPG*, *BMP2*, *Nfatc1*, *Runx2*, *Irf-8*) e à modulação imune (*Capns1*), utilizando *Gapdh* como controle endógeno. A seleção dos genes baseou-se em achados prévios do grupo de pesquisa, com foco nos efeitos da CNV sobre a inflamação periodontal e a reabsorção óssea.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4 e revelam que tanto o tratamento com CNV quanto com clorexidina (CHX) promoveram alterações significativas na expressão de genes associados à inflamação e ao metabolismo ósseo em ratos com periodontite induzida. A expressão de *Egr1* e *Birc3* foi significativamente reduzida nos grupos tratados em comparação ao grupo LIG, indicando uma possível redução na ativação de vias inflamatórias e na sobrevivência celular patológica, já que esses genes estão relacionados à proliferação, diferenciação e resposta imune exacerbada.

Além disso, observou-se diminuição na expressão de *Icam1*, *Calm1*, e *Irf8* nos grupos CNV e CHX. Essa redução pode contribuir para um ambiente menos inflamatório, uma vez que *Icam1* está envolvido na adesão e migração de leucócitos, *Calm1* participa da produção de óxido nítrico, um mediador pró-inflamatório, e *Irf8* atua na regulação da diferenciação celular do sistema imunológico. No grupo tratado com CHX, também houve redução significativa de *Nfatc1*, gene essencial para a diferenciação de osteoclastos, sugerindo uma menor atividade osteoclástica e, possivelmente, menor reabsorção óssea.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de *Bmp2*, *Egfr* e *Capns1*, os níveis desses genes mantiveram-se relativamente estáveis, com tendência de aumento no grupo CNV, o que pode indicar um possível estímulo à regeneração tecidual. Também foi observado que a expressão de *Runx2* foi significativamente reduzida nos grupos tratados, o que pode refletir uma modulação da diferenciação osteoblástica. Já o gene *Tnfrsf11a* (*Rank*) apresentou redução expressiva nos grupos CNV e CHX, sugerindo diminuição da sinalização para a formação de osteoclastos.

Por fim, genes como *EgrF* e *Mmp7* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, enquanto o gene *Wnt5a* mostrou aumento no grupo CNV, reforçando seu potencial

papel na via de remodelação óssea e regeneração. Esses achados reforçam o potencial terapêutico da CNV, que demonstrou não apenas efeito anti-inflamatório, mas também possível atuação na modulação do metabolismo ósseo, sendo uma alternativa promissora à clorexidina no tratamento da periodontite.

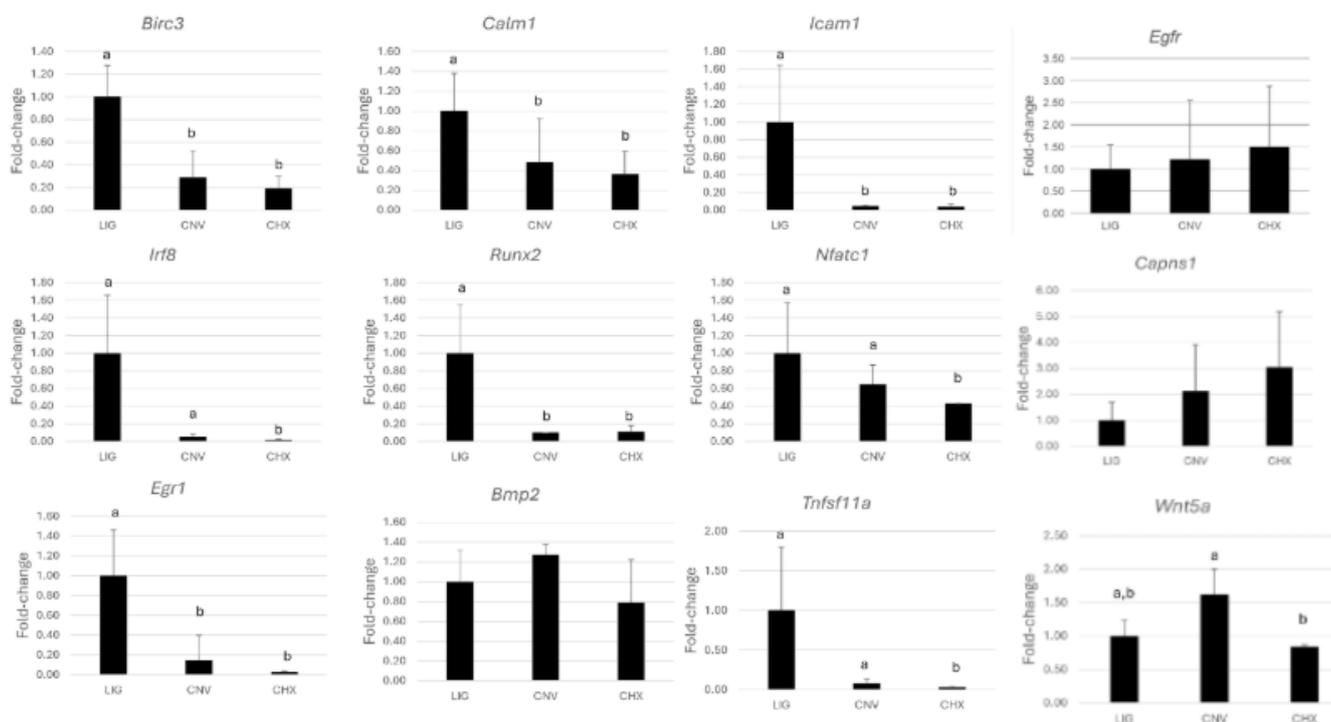


Figura 4. Média e desvio padrão da expressão gênica de *Birc3*, *Calm1*, *Icam1*, *Irf-8*, *Runx2*, *Nfatc-1*, *Egr1*, *Bmp2*, *Tnfrsf11a* (*Rank*), *Egfr*, *Wnt5a* e *Capns1* em animais dos grupos LIG, CNV e CHX. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos de ligaduras, determinada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido da análise post hoc de Dunn ( $p \leq 0,05$ ).

O tratamento tópico diário com a CNV, isolados da própolis vermelha e formulados em PL-407, contribuiu para a diminuição da perda óssea interproximal e apresentou efeitos benéficos no controle da doença periodontal. Esses efeitos foram associados à ação antimicrobiana dos compostos, demonstrada pela redução na contagem total do biofilme, com destaque para microrganismos periodontopatogênicos (dados não mostrados no presente trabalho). A ação anti-inflamatória foi evidenciada pela redução na expressão de genes pró-inflamatórios, como *Birc3*, *Icam1* e *Egr1*.

## BIBLIOGRAFIA:

ABDULKAREEM, A. A.; AL-TAWEEL, F. B.; AL-SHARQI, A. J. B.; GUL, S. S. et al. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol*, 15, n. 1, p. 2197779, 2023.

AKKARI, A. C. S.; PAPINI, J. Z. B.; GARCIA, G. K.; FRANCO, M. K. K. D. et al. Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 68, p. 299-307, Nov 01 2016.

ALMHÖJD, U. S.; LEHRKINDER, A.; ROOS-JANSÅKER, A. M.; LINGSTRÖM, P. Antimicrobial efficacy of chlorine agents against selected oral pathogens. *Clin Oral Investig*, 27, n. 9, p. 5695-5707, Sep 2023.

BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S.; FRANCO, G. C. N.; CASTRO, M. L.; VIEIRA, M. S. et al. Protective effects of desipramine on alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 91, n. 12, p. 1694-1703, Dec 2020.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*, 61, n. 19, p. 4546-4550, May 15 2013.

BUENO-SILVA, B.; BUENO, M. R.; KAWAMOTO, D.; CASARIN, R. C. et al. Anti-Inflammatory Effects of (...). *Pharmaceuticals (Basel)*, 15, n. 5, Apr 29 2022.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; MAYER, M. P. A. Vestitol drives LPS-activated macrophages into M2 phenotype through modulation of NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunopharmacol*, 82, p. 106329, Feb 27 2020.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. D.; MAYER, M. P. A. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. *Journal of Functional Foods*, 36, p. 440–447, 2017.

DE FIGUEIREDO, K. A.; DA SILVA, H. D. P.; MIRANDA, S. L. F.; GONÇALVES, F. J. D. S. et al. Brazilian Red Propolis Is as Effective as Amoxicillin in Controlling Red-Complex of Multispecies Subgingival Mature Biofilm In Vitro. *Antibiotics (Basel)*, 9, n. 8, Jul 22 2020.

DE OLIVEIRA, I. C. V.; GALVÃO-MOREIRA, L. V.; VILELA, J. L.; DUARTE-SILVA, M. et al. Cinnamaldehyde modulates host immunoinflammatory responses in rat ligature-induced periodontitis and peripheral blood mononuclear cell models. *Int Immunopharmacol*, 115, p. 109669, Feb 2023.

KITAURA, H.; MARAHLEH, A.; OHORI, F.; NOGUCHI, T. et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci*, 21, n. 14, Jul 21 2020.

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, p. S173-S182, Jun 2018.

PAPATHANASIOU, E.; KANTARCI, A.; KONSTANTINIDIS, A.; GAO, H. et al. SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Dent Res*, 95, n. 9, p. 1018-1025, Aug 2016.

ZHAO, B.; TAKAMI, M.; YAMADA, A.; WANG, X. et al. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*, 15, n. 9, p. 1066-1071, Sep 2009.

ZHAO, H.; HU, J.; ZHAO, L. Adjunctive subgingival application of Chlorhexidine gel in nonsurgical periodontal treatment for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*, 20, n. 1, p. 34, Jan 31 2020.

ZHOU, M.; GRAVES, D. T. Impact of the host response and osteoblast lineage cells on periodontal disease. *Front Immunol*, 13, p. 998244, 2022.