

Efeito do tratamento por via oral com os compostos neovestitol e vestitol no perfil de citocinas e volume ósseo de animais com doença periodontal experimental

Palavras-Chave: PERIODONTITE, MICROCT, NEOVESTIOL E VESTIOL

Autores(as):

SAYADH MALKI JIBRAIL SIRYANI, FOP – UNICAMP

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

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

INTRODUÇÃO:

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica, de origem infecciosa, associada à presença de biofilme dental patogênico. A maturação desse biofilme desencadeia respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro que, embora tenham como objetivo conter a infecção, podem levar à destruição dos tecidos moles e do osso de suporte dentário (Papapanou et al., 2017).

Diante das limitações das terapias convencionais, produtos naturais têm sido investigados como alternativas promissoras. A própolis vermelha brasileira, rica em neovestitol e vestitol, apresenta propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias demonstradas em estudos *in vitro* ((Bueno-Silva et al., 2015)Miranda et al., 2019).

Diante desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, em modelo *in vivo*, o potencial terapêutico da CNV, na forma de solução hidroalcoólica de uso oral, para o controle da doença periodontal. Para isso, foram realizadas análises da resposta inflamatória, por meio da quantificação de citocinas utilizando a tecnologia Luminex, além da avaliação do volume e porosidade óssea por microtomografia computadorizada (MicroCT).

METODOLOGIA:

A doença foi induzida por inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis* (W83) e pela colocação de ligaduras subgingivais no 1º molar mandibular. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Guarulhos e seguiram as diretrizes do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, 1996).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=6/grupo) com diferentes tratamentos: LIG (ligadura e tratado somente com veículo-controle), CNV-VO (ligadura e tratados com CNV à 20 mg/kg), METRO (ligadura e tratados com metronidazol à 100mg/Kg) e SHAM

(sem ligadura e sem tratamento). Os tratamentos foram realizados via gavagem uma vez ao dia por 14 dias, iniciando-se 24 horas após a colocação da ligadura. No 15º dia, os animais foram anestesiados e, posteriormente, foi realizado a eutanásia por overdose de cetamina/xilazina.

As mandíbulas foram coletadas para análise do volume ósseo e porosidade por microtomografia computadorizada (MicroCT). O tecido gengival ao redor do primeiro molar mandibular foi removido para quantificação das citocinas inflamatórias, utilizando a tecnologia Luminex.

Preparação de amostra, aquisição e análise de imagem μ CT

As imagens foram obtidas por meio de MicroCT SkyScan 1174v2 Compact (Bruker Corp., Kontich, BelgicSkyScan), com as amostras fixadas em cera sobre uma haste metálica. A varredura foi realizada com 50 kVp, 800 μ A e filtro de alumínio de 0,5 mm (Marana et al., 2022), além de pixel padronizado em 20,0 μ m e aquisição a cada 0,6°, totalizando 180° e 300 projeções por amostra. As reconstruções foram feitas no software SkyScan NRecon (Kontich, Bélgica), enquanto as análises foram realizadas pelo software CT Analyzer (Bruker Corp., Kontich, Bélgica, SkyScan), com segmentação manual, seguida de binarização e avaliação morfométrica (volume ósseo e porosidade).

Quantificação de citocinas por meio da tecnologia do Luminex

Foi realizado a extração de proteínas dos tecidos circundantes do primeiro molar mandibular, com utilização de 0,2g de sílica beads (0,5mm) em criotubos de 2 mL (sendo um para cada amostra), acrescentado 300 μ L de PBS, levado ao BeadBeater e ligado por 1 minuto, após a quebra dos tecidos, foi realizada centrifugação a 4°C, 13000g, por 8 minutos e coletado o sobrenadante. Por conseguinte, foi feita dosagem de concentração de proteínas com reagente de Bradford, e leitura realizada no espectrofotômetro a 550 nm. Por fim, os níveis de G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α dos tecidos gengivais circundantes foram determinados por meio da tecnologia luminex.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados demonstraram diferenças significativas no volume ósseo entre os grupos de animais tratados com CNV-VO e metronidazol (METRO) quando comparados aos grupos LIG e SHAM. Ademais, evidenciou-se também que o tratamento com a combinação de neovestitol e vestitol (CNV) demonstrou potencial efeito anti-inflamatório ao elevar os níveis de duas citocinas reguladoras: IL-10 e IL-13, quando comparados ao grupo SHAM (sem ligadura) e ao grupo apenas com ligadura (LIG).

Conforme apresentado na Figura 1A, o grupo SHAM (sem ligadura), incluído apenas na comparação com o grupo LIG, apresentou aproximadamente o dobro do volume ósseo em relação ao grupo LIG (com ligadura e tratado com veículo-controle) ($p \leq 0,05$). Entre os grupos com ligadura, os animais tratados com CNV-VO e metronidazol (METRO) apresentaram aumento significativo no volume ósseo em comparação ao grupo LIG. O grupo CNV-VO exibiu cerca de 56% a mais de volume ósseo,

enquanto o grupo METRO apresentou um aumento de aproximadamente 58% em relação ao grupo LIG ($p \leq 0,05$).

Enquanto em relação a porosidade óssea (Figura 1B), o grupo SHAM apresentou cerca de 60% do grupo LIG enquanto os grupos CNV-VO e METRO apresentaram cerca de 80% dos valores de porosidade do grupo LIG ($p \leq 0,05$). A Figura 1C mostra imagens representativas de cada um dos grupos: SHAM, LIG, CNV-VO e METRO.

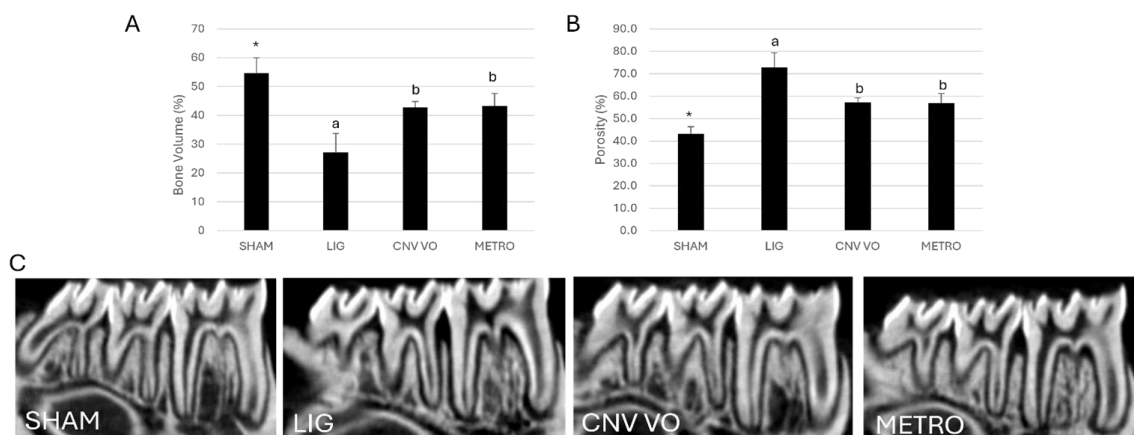


Figura 1: Média e desvio padrão da porcentagem (%) do volume ósseo (A) e da porosidade (B) das mandíbulas dos animais. A Figura C apresenta imagens representativas de cada grupo. O símbolo “*” indica uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos SHAM e LIG. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de ligaduras, conforme determinado pela análise de Kruskal-Wallis seguida pelo teste post-hoc de Dunn ($p \leq 0,05$).

Os grupos tratados com CNV-VO e METRO apresentaram maior volume ósseo em comparação ao grupo LIG, indicando um efeito protetor desses tratamentos contra a perda óssea causada pela periodontite. Embora ambos tenham reduzido a reabsorção óssea, o CNV-VO mostrou um potencial significativo na preservação do tecido ósseo, destacando-se como uma alternativa terapêutica promissora.

No que se refere à porosidade óssea (Figura 1B), os dados indicam que o grupo SHAM apresentou menor porosidade em comparação ao grupo LIG, confirmando a degradação óssea associada à doença periodontal. Os grupos tratados com CNV-VO e METRO apresentaram uma redução na porosidade óssea em relação ao grupo LIG, o que sugere que ambos os tratamentos contribuíram para a manutenção da integridade óssea.

A figura 2 mostra os resultados da produção de G-CSF, IL-1 α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-12p70, GM-CSF, TNF- α dos tecidos gengivais dos animais só com ligadura e 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).

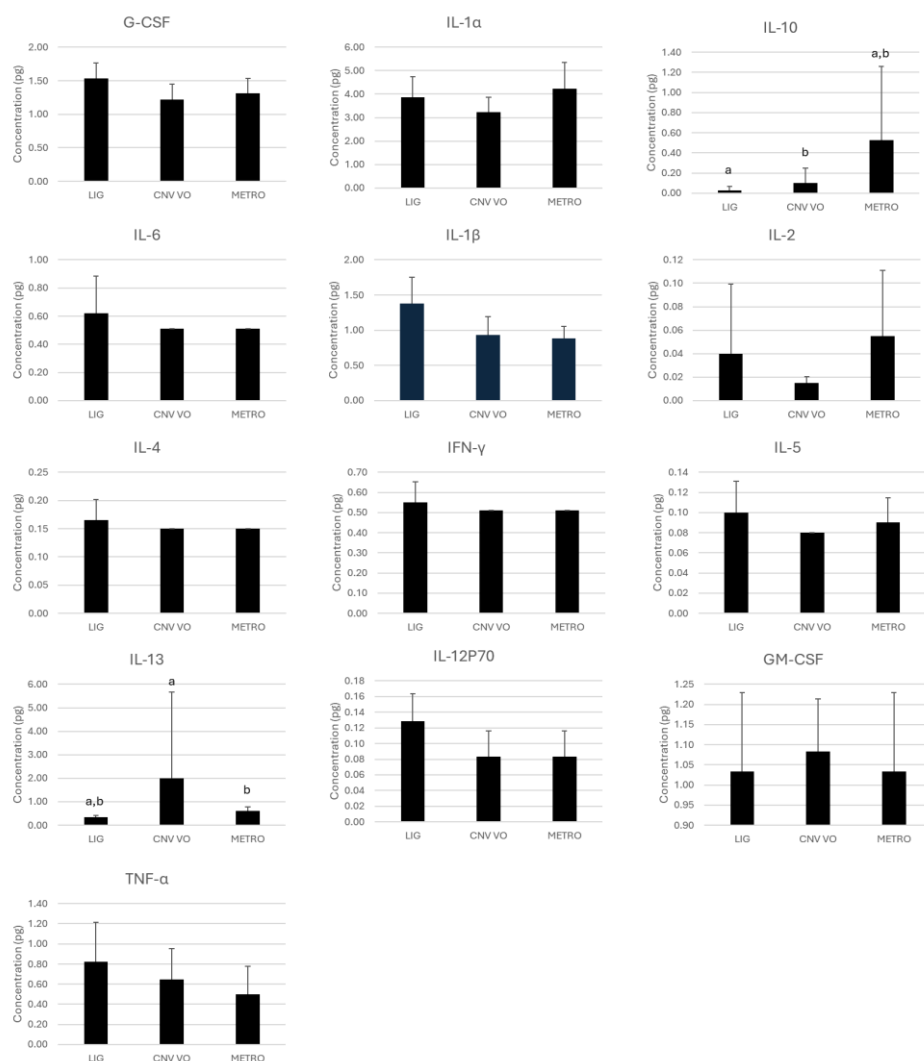


Figura 2: Média e desvio padrão da produção de G-CSF, IL-1α, IL-10, IL-6, IL-1β, IL-2, IL-4, IFN-γ, IL-5, IL-13, IL-12p70, GM-CSF, TNF-α dos animais sem tratamento (LIG) e tratados com a combinação neovestitol e vestitol na dose de 20 mg/Kg de peso (CNV-VO) e com metronidazol a 100 mg/Kg (METRO). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos com ligadura por meio de análise estatística com Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Em relação às citocinas envolvidas no processo inflamatório periodontal, sabe-se que o acúmulo de biofilme bacteriano promove uma desregulação da resposta imune, contribuindo para a ruptura da homeostase do tecido ósseo. Nesse contexto, observou-se que o tratamento com CNV-VO levou a um aumento significativo na produção de IL-10 em comparação ao grupo LIG ($p < 0,05$), o que indica uma potencial ação anti-inflamatória dos compostos. A IL-10 exerce um papel central na proteção do hospedeiro, atenuando respostas imunes exacerbadas frente a patógenos e à microbiota residente, além de estar envolvida em processos como a cicatrização tecidual e a modulação de doenças autoimunes, comumente associadas à periodontite (Saraiva, Vieira, O'Garra, 2020). Complementarmente, o aumento da IL-13 no grupo CNV-VO em relação ao grupo METRO ($p < 0,05$) reforça a ação imunomoduladora do tratamento, uma vez que essa citocina atua na regulação da atividade de mastócitos, macrófagos, eosinófilos e células B, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Jeong et al., 2021). Esses achados sugerem que o CNV-VO pode contribuir para o controle da inflamação periodontal por meio da indução de uma resposta imune reguladora.

CONCLUSÕES:

Conclui-se, que, de acordo com os resultados obtidos através deste presente estudo, o tratamento com a combinação de neovestitol e vestitol em solução hidroalcoólica (CNV-VO) promoveu significativa preservação do volume ósseo e redução da porosidade em modelo experimental de periodontite, com desempenho comparável ao do metronidazol. Ademais, promoveu também efeito anti-inflamatório ao elevar os níveis de citocinas reguladoras, como IL-10 e IL-13. Esses achados indicam o potencial terapêutico da CNV-VO como alternativa no controle da perda óssea induzida pela doença periodontal, reforçando a relevância de produtos naturais no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

BIBLIOGRAFIA

- BUENO-SILVA, Bruno *et al.* Anti-Inflammatory Effects of (3S)-Vestitol on Peritoneal Macrophages. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 553, abr. 2022.
- JEONG JY, Wi R, CHUNG YC, JIN BK. Interleukin-13 Propagates Prothrombin Kringle-2 Induced Neurotoxicity in Hippocampi In Vivo via Oxidative Stress. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 7, p. 3486, mar. 2021.
- MARANA, Rosana Rodrigues *et al.* Omega 3 polyunsaturated fatty acids: Potential anti-inflammatory effect in a model of ovariectomy and temporomandibular joint arthritis induction in rats. **Arch Oral Biol**. v. 134, p. 134:105340, 2022.
- MIRANDA, Stela Lima Farias *et al.* Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 308-319, mar. 2019.
- PAPAPANOU, Panos 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 Periodontology**, [S. l.], v. 89, n. S1, p. S173–S182, 2018.
- SARAIVA M, VIEIRA P, O’GARRA A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, jan. 2020.