

EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *Tocoyena Sellowiana* NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EM RATAS.

Debora da Silva Freitas Ribeiro¹; Jordânia Marques de Oliveira²; Samuel Mateus Pereira Filho³; Hellíada Vasconcelos Chaves⁴; Maria Rose Jane R. Albuquerque⁵; Mirna Marques Bezerra⁶

Resumo

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória que afeta as estruturas de suporte dos dentes e é caracterizado por uma destruição do osso alveolar, representando uma importante causa de perda de dentes em adultos. Os principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da lise óssea da periodontite incluem: citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e prostaglandinas (PG), particularmente PG da série E (PGE2). Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e a segurança do extrato de *Tocoyena sellowiana* em um ensaio pré-clínico de periodontite em ratas. **Metodologia:** A periodontite foi induzida por colocação de um fio de nylon (3.0) nos molares superiores de ratas *Wistar* (180-200 g). Os animais (6 por grupo) foram pesados e tratados (*per os*) diariamente com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) ou veículo (solução salina) durante 11 dias. Após esse intervalo de tempo, os animais foram sacrificados sob anestesia e as maxilas removidas para análise da reabsorção óssea alveolar utilizando o software ImageJ[®]. Ainda, coletou-se amostras de sangue periférico para análise bioquímica (alanina amino transferase - AST, aspartato amino-transferase - ALT, creatinina e fosfatase alcalina - TAP). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (52/12). O extrato de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg / kg) reduziu ($p < 0,05$), a reabsorção alveolar ($4,96 \pm 0,39$; $3,89 \pm 0,13$ e $1,74 \pm 0,15$, respectivamente), em comparação com o grupo de veículo ($7,09 \pm 0,43$). Os níveis séricos de ALT/AST, creatinina e FAT não diferiram de seus controles. **Conclusão:** Os resultados sugerem que *Tocoyena sellowiana* é eficaz e segura no modelo de periodontite em ratas.

Palavras-chave: *Tocoyena sellowiana*; Periodontite; reabsorção óssea.

Introdução

A periodontite é um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos de sustentação dos dentes caracterizada por infiltrado celular inflamatório intenso e extensa reabsorção óssea. Representa a principal doença responsável por perda de dentes em adultos e a caracterização dos mecanismos celulares e moleculares que formam a base desse processo destrutivo, assim como seu diagnóstico e tratamento, ainda carece de maior estudo. (SLOTS, 2013). Os principais mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo, em especial na atividade ósteo-reabsortiva, são as citocinas do tipo interleucina 1 (IL 1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e a prostaglandina E2 (PGE2) (COCHRAN, 2008).

A etiopatogenia da periodontite é multifatorial, destacando-se a presença do agente infeccioso, placa bacteriana, e a resposta inflamatória e imune do hospedeiro, com a participação de mediadores inflamatórios. Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedem os microrganismos de se disseminarem ou invadirem os tecidos. Em alguns casos, essas reações de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais porque também são passíveis de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido

conjuntivo. Além disso, as reações inflamatórias e imunológicas cuja extensão alcança níveis mais profundos do tecido conjuntivo, além da base do sulco, podem envolver o osso alveolar nesse processo destrutivo. Assim, tais processos defensivos podem, paradoxalmente, responder pela maior parte da lesão tecidual observada na periodontite (ARAÚJO *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, refletindo em uma melhor qualidade de vida da população (ELDIN & DUNFORD, 2001).

O gênero *Tocoyena* (família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae) possui cerca de 30 espécies, representado por árvores de pequeno porte ou arbustos, típicas do Cerrado (PEREIRA *et al.*, 2004). A *Tocoyena sellowiana* é uma árvoreta conhecida popularmente como genipapo bravo, cuja casca do caule é utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório. Este trabalho investigará a eficácia e segurança do extrato etanólico da casca do caule de Ts em um ensaio pré-clínico de periodontite.

Metodologia (Materiais e Métodos)

Foram utilizados 30 ratas Wistar fêmeas (180-200g) provenientes do Biotério Central do Campus do Pici. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso à água e comida a uma temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ obedecendo a ciclos de claro-escuro de 12h. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo 52/2012).

Os animais foram divididos em cinco grupos de 6 animais cada e pré-tratados com salina (veículo) ou com Ts (0,1;1 ou 10 mg/kg). O grupo o naive representa animais não submetidos a qualquer manipulação. Após 30 min do tratamento os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5% (1ml/100g). A periodontite experimental (PE) foi induzida através da colocação cirúrgica de um fio de náilon (3-0) na cervical do segundo molar superior esquerdo. Após a indução da PE, os animais foram pesados e tratados com Ts (0,1;1 ou 10 mg/kg) ou salina, diariamente durante 11 dias.

Após 11 dias da indução da PE, os animais foram eutanasiados, sob anestesia, e as hemiarcadas foram removidas, dissecadas, fixadas em formol 10% durante 24 horas e coradas em azul de metileno 1%, para posterior análise morfométrica. Após esses procedimentos as hemiarcadas foram montadas em cera de abelha, fotografadas e analisadas por meio do software Image J®. A medida da reabsorção óssea alveolar foi feita subtraindo a área total da hemiarcada esquerda (com ligadura) da hemiarcada direita (sem ligadura). Um periodontista experiente

(A.A.R.S) que desconhecia o protocolo de tratamento fez as medições. Ademais, aos 11 dias da PE, amostras de sangue periférico foram colhidas, centrifugas e o plasma armazenado (-200 C) para posteriores dosagens bioquímicas (ALT, AST, creatinina e fosfatase alcalina total).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni, adotando-se o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism (versão 5.0).

Resultados e Discussão

Os animais submetidos à indução da PE apresentaram perda óssea alveolar significativa ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle. A permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a periodontite reproduzindo os principais sinais clínicos da doença em humanos, tais como: reabsorção óssea, exposição alveolar de raiz e perda de contato interdental.

A análise morfométrica demonstrou redução da perda óssea alveolar nos grupos tratados com Ts (0,1; 1 ou 10 mg/kg) ($4,96 \pm 0,39$, $3,89 \pm 0,13$ e $1,74 \pm 0,15$, respectivamente), quando comparado ao grupo de veículo ($7,09 \pm 0,43$).

Além disso, Ts (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não afetou ($p < 0,05$) os níveis séricos de creatinina, assim como os níveis séricos das enzimas hepáticas (AST, ALT e Fosfatase Alcalina Total), quando comparado aos animais controle.

No presente estudo foi demonstrada que a indução da periodontite através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares promoveu extensa reabsorção óssea alveolar após 11 dias. De fato, o uso da ligadura de náilon possui um papel fundamental para o início da periodontite experimental, contribuindo para a retenção do biofilme bacteriano e ativação da resposta imune-inflamatória do hospedeiro, determinando extensa perda óssea alveolar (LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2000; AZOUBEL *et al.*, 2007).

Nosso grupo já demonstrou que a perda óssea alveolar nesse modelo tem início a partir do 3º dia após a indução da periodontite, atingindo o máximo aos 11 dias, e mantendo-se na mesma magnitude até o 14º dia, com menor atividade osteoclástica neste intervalo de tempo, quando comparado aos 11 dias (SOUZA, 2011). Entretanto, embora se observe resolução parcial do processo inflamatório aos 14 dias, a perda óssea alveolar não é revertida, persistindo o dano aos tecidos periodontais, com destruição do processo alveolar, presença de bolsas periodontais profundas, mobilidade dentária, resultando em perda de função e, na grande maioria dos casos, em exfoliação dos dentes afetados. Esses achados demonstram a utilidade desse modelo por reproduzir

as principais manifestações clínicas da periodontite observadas em humanos e poder auxiliar na investigação dos mecanismos envolvidos na lise óssea associada com essa doença.

Este trabalho demonstrou o efeito protetor da *Tocoyena sellowiana* na perda óssea em modelo de periodontite experimental em ratas. As plantas pertencentes a essa família são amplamente utilizadas na medicina popular no tratamento de diversos tipos de doenças, mas sem comprovação científica.

Nenhum trabalho, até o momento, mostrou o seu envolvimento no mecanismo de perda óssea alveolar. O tratamento com *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10mg/ kg per os), em nosso estudo, reduziu de forma significativa a perda óssea alveolar observada após 11 dias de indução da periodontite, quando comparado ao grupo controle (salina). Esses resultados podem estar relacionados com a propriedade anti-inflamatória do ácido quinóvico presente no extrato de *Tocoyena sellowiana*, conforme demonstrado no estudo de Baba e colaboradores (1992).

Uma vez demonstrada a eficácia de *Tocoyena sellowiana* na periodontite experimental em ratas, buscou-se avaliar sua segurança no modelo. A avaliação de testes de enzimas hepáticas podem ser divididos naqueles que refletem lesão hepatocelular e naqueles que refletem aumento na produção enzimática consequente à colestase ou indução por drogas (LIMA *et al.*, 2001).

O citoplasma do hepatócito é rico em alanina aminotransferase (ALT), um insulto (toxina, hipóxia) à membrana hepatocelular resulta num aumento da ALT sérica, de forma aguda (horas ou dias). As mais altas concentrações de aspartato aminotransferase (AST) estão localizadas principalmente nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos. Cerca de 60 a 80% do AST do interior de hepatócitos está associado às mitocôndrias e o restante em forma solúvel no citossol. No presente estudo, a administração de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não modificou a atividade de ALT e AST, quando comparado ao grupo controle.

Fosfatase Alcalina total (FAT) abrange praticamente todos os tecidos, sendo, contudo, mais abundante nos ossos, rins e no fígado. No nosso estudo, os valores de FAT dos animais submetidos as dose de 0,1; 1 ou 10 mg/kg mostraram-se normais quando comparados com o grupo controle, sugerindo assim que o tratamento com *Tocoyena sellowiana* não afeta as funções hepáticas.

A creatinina é formada através do metabolismo da creatina e fosfocreatina muscular. O nível sanguíneo não é afetado pela dieta, idade e sexo (SANTOS *et al.*, 2010). A creatinina é totalmente excretada pelos glomérulos renais, não havendo a reabsorção tubular. A creatinina pode estar elevada no soro devido a fatores pré-renais como diminuição do fluxo sanguíneo, renais como a diminuição da filtração glomerular e pós-renais como a ruptura e/ou obstrução do trato urinário (DANTAS *et al.*, 2006). Também foram determinados os níveis séricos de creatinina, usados para avaliação da função renal, evidenciando que o uso de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10mg/kg) não provoca lesão renal.

Conclusão (Considerações Finais)

A administração de *Tocoyena sellowiana* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) durante 11 dias a animais submetidos à indução da periodontite é eficaz, reduzindo a reabsorção óssea alveolar, representando uma opção terapêutica segura nesse modelo animal.

Agradecimentos

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FUNCAP, INCT e UFC.

Referências

ARAUJO M. G.; SUKEKAVA F. Epidemiologia da Doença Periodontal na América Latina. **R. Periodontia**, v. 17, 2007.

AZOUBEL, M.C.F., MENEZES, A.M.A., BEZERRA ,D., ORIÁ, R.B., RIBEIRO , R.A. AND BRITO, G.A.C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 40, n.1, Jan. 2007.

BABA, S.; AKRELE, O; KAWAGUCHI, Y. Natural Resources and Human Health – Plants of medicinal and nutritional Value. 1992, p.133.

BEZERRA, M.M, LIMA, V, ALENCAR, V.B.M. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**. 71:1009-1014. 2000.

COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Revista Acta Sci Health Sci**. 28(2):p.165-170, 2006

ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária à saúde. 4. ed. São Paulo: Manole, 2001.

HERNÁNDEZ, M., DUTZAN, N., GARCÍA-SESNICH, J., ABUSLEME, L., DEZEREGA, A., SILVA, N., GONZÁLEZ, F. E., R. VERNAL, R., SORSA, T., GAMONAL, J. *, Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis, **J Dent Res** 90(10):1164-1170, 2011.

LIMA, V., BEZERRA, M.M., MENEZES ALENCAR, V.B., VIDAL, F.D., ROCHA F.A., CASTRO BRITO, G.A., ALBUQUERQUE RIBEIRO ,R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci.** 108 (2):123-9, 2000

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T. , MELO, J. P. L. C., Ferreira, R. C. Q.; SILVEIRA, E. J. D. , DANTAS, E. M.. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas, **Rev. Cir. Traumatol. Buco Maxilo-fac**, Camaragibe, v.7, n.2, p. 29 - 36, abr./jun. 2007

SANTOS, M. R. V; SOUZA, V. H., MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO, A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena** 6, 2010.

SLOTS, J., Periodontology: past, present, perspectives, **Periodontology** 2000, Vol. 62, 2013, p. 7–19.

SOUZA, R.B., Análise da Expressão do RNAm de Ciclo- Oxigenase-2 e Hemeoxigenase-1 Durante a Progressão da Periodontite em Ratos: Efeito do Ranelato de Estrôncio.2011. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011

PEREIRA, M. S., BARBOSA, M. R. V., A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 18(2): 305-318, 2004.

¹Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista da CAPES. Universidade Federal do Ceará-UFC *campus* Sobral. vetdebora@hotmail.com;

²Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará-UFC *campus* Sobral. jordaniafreire25@gmail.com;

³Discente do Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. samuelmateus.ufc@hotmail.com;

⁴Docente Prof^ª Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves. Curso de Odontologia. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. helliadachaves@yahoo.com.br;

⁵Co-orientador. Prof^ª Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque. Universidade Vale do Acaraú- UVA. rjane_7@hotmail.com;

⁶Orientador. Prof^ª Dra. Mirna Marques Bezerra. Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. mirnabrayner@gmail.com;