

## DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS WISTAR: RELAÇÃO ENTRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR APÓS TRATAMENTO COM GEL DE *Limonium brasiliense*.

Driele Fernanda Schneider (CNPq/UEM), Ana Paula Fiorotto, Luzmarina Hernandez (Orientador) e-mail: luzhernandes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR

**Área: Ciências Biológicas**      **Sub área: Morfologia**

**Palavras-chave:** citocinas, fitoterápicos, reabsorção óssea

### Resumo

A doença periodontal (DP) é uma infecção gengival que pode evoluir para perda dentária pois atinge os tecidos do periodonto de sustentação. Em estudo recente, em modelo de DP induzida, o gel de *Limonium brasiliense* 1% reduziu a inflamação dos tecidos periodontais e a perda óssea alveolar do segundo molar superior. O objetivo deste estudo foi avaliar, por método imuno-histoquímico, a expressão de citocinas pró-inflamatórias na região de tecido conjuntivo próxima ao epitélio juncional, e mensurar a área do osso alveolar, por método morfométrico, na região da furca, após a indução da DP em ratos tratados com gel de *L. brasiliense*. Os grupos analisados foram (1) controle negativo, sem indução de doença, (2) controle positivo, com DP sem tratamento, (3) doença tratada com gel de *L. brasiliense* 0,5%, (4) 1%, (5) 2% e (6) com clorexidina 0,12%. O grupo tratado com *L. brasiliense* 1% apresentou melhor preservação do osso alveolar na região da furca, quando comparado com os demais grupos. A expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Interleucina-6) e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) foi representada com base na intensidade de imunocoloração, sendo classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++). Os grupos 1%, 2% e controle positivo apresentaram maior intensidade de coloração para IL-6, e o grupo tratado com gel a 1% maior intensidade para TNF- $\alpha$ . Concluímos que o grupo tratado com gel de *Limonium brasiliense* a 1% teve menor perda óssea alveolar em região de furca.

### Introdução

A doença periodontal é uma infecção que afeta as estruturas de suporte dos dentes e gera danos no aparato periodontal (Cardoso et al., 2018). Se caracteriza pelo desenvolvimento de biofilme bacteriano e desenvolvimento de resposta inflamatória mediada por citocinas inflamatórias sendo as principais a interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e metaloproteinase 8 (MMP-8). A IL-6 estimula a produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos e em conjunto com a IL-1 induz o recrutamento de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (Euler et al., 1998). O sistema imune ativado pelas bactérias, principalmente macrófagos e monócitos, produzem a citocina TNF- $\alpha$  que atua como mediador de destruição tecidual e estimula a degradação óssea. Em estudo anterior foi demonstrada a ação

anti-inflamatória do gel de *Limonium brasiliense* a 1% na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos (Amaral,2019). Dando continuidade ao trabalho de Amaral (2019), o objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) por meio de método imuno-histoquímico e quantificar a área de reabsorção óssea alveolar remanescente, na região da furca.

## Materiais e Métodos

### Experimentação animal

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pelo CEUA/UEM N° 8930141118. Foram utilizados ratos Wistar machos, com cerca de 65 dias de idade, provenientes do biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram divididos em seis grupos de acordo com o tratamento: (1) controle negativo, sem indução de doença, (2) controle positivo, com DP sem tratamento, (3) doença tratada com gel de *L. brasiliense* 0,5%, (4) 1%, (5) 2% e (6) clorexidina 0,12%.

A doença foi induzida por meio da colocação de ligadura de algodão n°10 no sulco gengival no segundo molar superior, de cada rato. A ligadura permaneceu em íntimo contato com os tecidos gengivais. O tratamento foi iniciado imediatamente após a colocação da ligadura. O gel foi aplicado com *microbrush* durante um minuto, duas vezes ao dia, até o dia da eutanásia, no décimo primeiro dia.

As amostras contendo os molares foram coletadas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas, descalcificadas, entre 4 e 11 dias e a seguir processadas para inclusão em parafina. As lâminas foram coradas com HE para estudo morfométrico e imunocoradas para avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias.

### Análise morfométrica do osso alveolar

Os cortes histológicos corados com H&E foram analisados quanto a quantidade de osso alveolar na região da furca, por meio do *Software Imagem-Pro Plus®* (versão 4.5- Media Cybernetics). Foram utilizados 40 cortes por grupo. As imagens foram capturadas com câmera Nikon Digital Sight – DS-fi1C (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio Nikon Eclipse® 80i (Tóquio, Japão), com objetiva de 4X e analisadas por dois observadores treinados, usando o *software Image pro Plus*. O resultado da área média de osso alveolar foi expresso em micrometros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ).

### Análise imuno-histoquímica

Os cortes foram processados pelo método de imunocoloração usando a técnica de peroxidase. O material foi incubado com os anticorpos primários: anti-IL6 (abcam® - ab6672); TNF- $\alpha$  (biorbyt® – orb7100) nas concentrações de 1:100. As lâminas foram reveladas usando o *kit* comercial *Histostain Plus®* (Zymed Laboratories Inc.®). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Meyer. A intensidade da imunocoloração foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++), baseado na intensidade de coloração da área, incluindo células e matriz extracelular.

### Análise estatística

A comparação das médias das áreas ocupadas por osso alveolar foi analisada em *software* GraphPad Prisma 7. Foi realizado o teste de normalidade seguido do teste “t” de Student monocaudal. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Resultados e Discussão

A figura 1 mostra a área média  $\pm$  desvio padrão de tecido ósseo alveolar na região furca dos animais submetidos ao experimento. Observou-se que a doença periodontal provocou uma significativa ( $p < 0,05$ ) perda de osso alveolar quando são comparados os animais com DP com aqueles sem DP. O grupo tratado com gel 1% apresentou maior preservação óssea ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os demais grupos com doença. Em contrapartida, a maior perda óssea ocorreu nos animais tratados com o gel 2%.

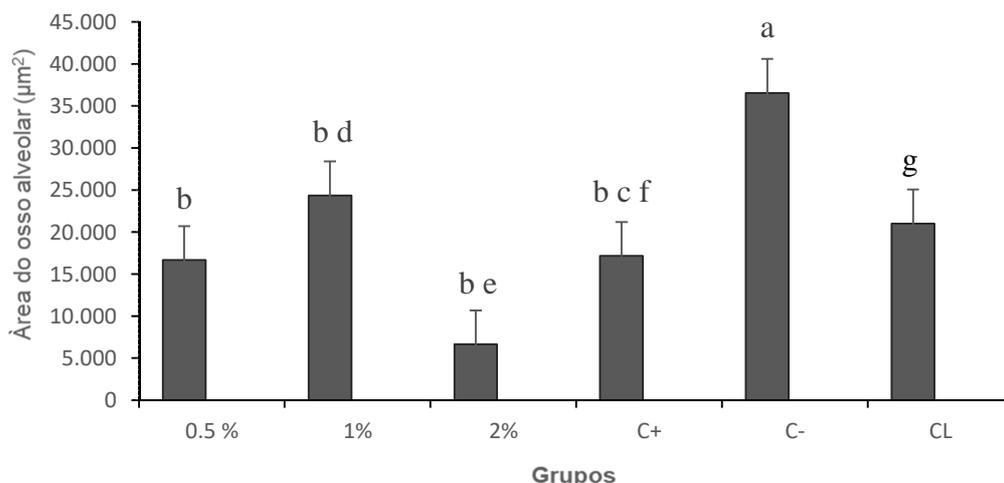


Figura 1: Área (média  $\pm$  DP) do osso alveolar na região da furca em ratos Wistar com doença periodontal induzida por ligadura, no 2º molar superior. Os animais foram tratados com gel de *Limonium brasiliense* (0,5%, 1% e 2%). Grupo C+: animais com doença, sem tratamento e Grupo C-: animais saudáveis, sem doença. Grupo CL: tratado com clorexidina 0,12%. [ $p < 0,05$  quando comparados (a com b), (c com d), (d com e), (e com f) e (g com a,e)].

O grupo tratado com o gel de *L. brasiliense* 1% apresentou maior área média de osso alveolar na região da furca, após indução da doença periodontal. Este resultado está em consonância com os resultados obtidos por Amaral (2019) que demonstrou, usando método semi-quantitativo por escores, que o gel de *L. brasiliense* 1% atuou de forma preventiva na reabsorção do osso alveolar nas regiões mesial e distal do segundo molar superior, e este resultado foi associado a uma resposta inflamatória que variou de leve a moderada neste grupo (Amaral, 2019).

Observamos ainda, neste estudo, que a área média do osso alveolar no grupo tratado com gel a 1% foi semelhante àquela do grupo tratado com clorexidina 0,12%, substância utilizada no tratamento considerado padrão-ouro para doença periodontal em humanos. Estes resultados demonstram que o gel de *L. brasiliense* 1% apresentou ação benéfica semelhante ao tratamento farmacológico de escolha.

Os resultados preliminares da imuno-histoquímica mostram que o grupo tratado com *L. brasiliensis* 1%, obteve maior intensidade de coloração (+++) para TNF- $\alpha$ . Além disso, a coloração foi mais intensa (+++) para IL-6 nos grupos tratados com *L. brasiliense* 1%, 2% e o Controle +. Sabe-se que, a expressão de citocina TNF- $\alpha$  age no processo de migração celular em múltiplos níveis, induzindo a *up-regulation* de moléculas de adesão e quimiocinas envolvidas na migração celular para sítios infectados e inflamados (Kindle et al., 2006). Tal resultado reforça que há outros fatores e outras citocinas envolvidas para que haja sinalização de absorção óssea, uma vez que, o grupo que obteve menor perda óssea alveolar também foi o grupo que mais expressou citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6.

## Conclusão

O tratamento da doença periodontal induzida com gel *Limonium brasiliense* 1% contribuiu para a preservação do osso alveolar, na região da furca, de forma semelhante ao tratamento farmacológico de escolha (clorexidina 0,12%). Este mesmo grupo apresentou forte intensidade de coloração para TNF- $\alpha$  e IL-6.

## Agradecimentos

Ao programa PIBIC, ao financiador CNPq pela oportunidade de estudo e à Universidade Estadual de Maringá pelo suporte. À professora Luzmarina Hernandez pela orientação e à mestrandia Ana Paula Fiorotto, pelo apoio técnico e na discussão dos resultados.

## Referências

AMARAL, G.A. **Ação do gel de *Limonium brasiliense* no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2019.

CARDOSO, E.M., REIS, C., MANZANARES-CÉSPEDES, M.C. **Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases.** Postgrad Med., v.130, n.1, p. 98-104, 2018.

EULER, G.J., MILLER G.A; HUTTER J.M. et al. **Interleukin6 in neutrophilis from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues.** J Endod., v.24, n. 7, 1998

KINDLE, L., ROTHE, L., KRISS, M., OSDOBY P., COLLIN-OSDOBY, P., **Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+**

31º Encontro Anual de Iniciação Científica  
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de  
**2022**

**monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts.** J Bone Miner Res v.21, p.193-206, 2006.