



EFEITO DA FRAÇÃO PROTEICA NÃO DIALISÁVEL DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA* NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA PERIODONTITE POR LIGADURA EM RATOS

Iracema Matos Melo¹, Marina Fiuza Sarte², Bianca Moreira Kurita³,
Nylane Maria Nunes Alencar³, Márcio Viana Ramos⁴, Vilma Lima³

¹Universidade Federal do Ceará, *campus* Sobral, Curso de Odontologia, ²Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, ³Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ⁴Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará.
iracemammelo@yahoo.com.br

Resumo

Periodontite é uma doença imunoinflamatória caracterizada por destruição óssea. *Calotropis procera* é um arbusto que possui propriedades farmacológicas. Investigou-se a fração proteica não dialisável do látex de *Calotropis procera* (PLCp) na reabsorção óssea alveolar (ROA) induzida em ratos. Para tanto, os animais receberam i.p. água para injeção (API; 2 ml/kg) ou PLCp (0,33, 1 ou 3 mg/kg) 30 minutos antes da ligadura do 2º molar e, diariamente, durante 11 dias, quando foram eutanasiados. Foram removidas as maxilas para análise macroscópica ou histológica, e os tecidos gengivais para mensurar a atividade da mieloperoxidase (MPO). Sistemicamente, avaliou-se leucograma, Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) sérica, bem como pesos úmidos dos rins, fígado e baço correlacionados com os respectivos pesos animais. A ligadura durante 11 dias aumentou a ROA e a MPO, reduziu a FAO ($p < 0,05$), e induziu leucocitose por neutrofilia e linfomonocitose ($p < 0,05$). PLCp (1 mg/kg) significativamente reduziu a ROA (26%) e a MPO (46,3%), comparados aos animais API. A PLCp não alterou os níveis de FAO (16,9%; $p > 0,05$), a leucocitose, o peso e os índices renal, hepático e esplênico, quando comparados aos animais API. Em suma, PLCp reduziu a inflamação e a ROA, sem induzir o anabolismo ósseo ou causar alterações sistêmicas importantes.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Látex. *Calotropis procera*.



Introdução

A periodontite é uma doença imunoinflamatória que afeta a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar, em resposta a patógenos e seus produtos. Possui alta prevalência e tem sido considerada uma das maiores causas de perda de dentes em adultos. Além disso, tem se destacado devido às possíveis repercussões sistêmicas, afetando outras doenças importantes, como artrite reumatoide (ARAÚJO *et al.*, 2015). Tal resposta do hospedeiro envolve diversas células, como neutrófilos, linfócitos e macrófagos, bem como vários mediadores da inflamação que culminam em estimular a ativação osteoclástica (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013). A ativação osteoclástica é influenciada pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), e pelo ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) presente em osteoblastos. De fato, tanto a diferenciação como a função dos osteoclastos são reguladas com o aumento da ligação de RANKL ao seu receptor RANK, o que por fim resulta em osteoclastogênese. Também associado a esse evento, um outro receptor naturalmente atraente para RANKL, denominado osteoprotegerina (OPG), e também produzido por osteoblastos e células da medula óssea, ao se ligar ao RANKL, previne que o mesmo se ligue ao RANK e, com isso, limite a osteoclastogênese (REDLICH; SMOLEN, 2012). *Calotropis procera*, uma planta laticífera, e principalmente seu látex, é comumente utilizado na medicina popular, sobretudo na Índia, para tratar doenças de pele, reumatismo e outras desordens (ALENCAR *et al.*, 2006). Em estudos com animais, a fração proteica não dialisável do látex de *Calotropis procera* (PLCp) foi capaz de reduzir a mucosite em hamsters, bem como o edema, o infiltrado leucocitário e abscessos, bem como redução de TNF- α , IL-1 β e da COX-2 (FREITAS *et al.*, 2012). Nesse sentido, considerando-se que a PLCp pode exercer um papel anti-inflamatório sistêmico, buscou-se avaliar seus efeitos na reabsorção óssea inflamatória induzida por ligadura em ratos.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos (200 \pm 20 g), acomodados em caixas (n=4/caixa), e receberam ração comercial balanceada e água à vontade. Inicialmente os animais foram



distribuídos em 4 grupos (n=6 cada) e receberam i.p. água para injeção (API; 2 ml/kg) ou PLCp (0,33, 1 ou 3 mg/kg), respectivamente, 30 min antes da indução da reabsorção óssea alveolar (ROA) e, diariamente, durante 11 dias. Dois grupos adicionais receberam API ou PLCp 1 mg/kg e foram conduzidos sob as mesmas condições para os estudos histológicos. A ROA foi induzida por ligadura (náilon 000) do 2º molar superior esquerdo, permanecendo por 11 dias, quando então foram eutanasiados, e removidas as suas maxilas para análises morfométrica ou histológica, e as gengivas para análise da atividade da mieloperoxidase (MPO). Para análise morfométrica, as hemimaxilas obtidas foram dissecadas, coradas, fotografadas e as imagens utilizadas para mensuração da área de reabsorção (ROA) entre a junção cimento esmalte e o a borda óssea remanescente. Para histopatologia, as hemimaxilas removidas foram fixadas em formol tamponado, desmineralizadas em solução EDTA, e processadas para inclusão em parafina e coloração H&E em lâminas com cortes seriados, nos quais foram considerados a região entre 1º e 2º molar para avaliação do grau de infiltrado leucocitário e grau de preservação de cimento e osso alveolar, bem como a histomorfometria da área de furca do 2º molar considerando o ponto mais alto da crista óssea alveolar remanescente e o teto da furca. Sistemicamente, amostras sanguíneas foram utilizadas para o leucograma e a dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO), e foram coletados fígado, rim e baço, cujos pesos foram comparados com as respectivas massas corporais animais no 11º dia. Os animais foram pesados diariamente, e os dados expressos como a variação de massa corpórea.

Resultados e Discussão

Nesse estudo, os 11 dias de ligadura causou intensa ROA ($4,73 \pm 0,42$), comparada às hemimaxilas não ligadas, ditas normais. Esses dados estão de acordo com diversos estudos do nosso laboratório (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2016), onde a ROA é induzida a partir do 5º, e com o pico de lesão entre os 7º e 11º dias (LIMA *et al.*, 2000). Corroborando, microscopicamente observou-se intensos infiltrado leucocitário, ROA e destruição importante do cimento [3 (2-3)], comparados ao normal [0 (0-0); $p < 0,05$]. Complementando, a ligadura aumentou ($p < 0,05$) a MPO (API= $16,208 \pm 3,639$; Normal= $3,096 \pm 0,610$), e a histometria nas regiões de furcas (API= $30,6 \pm 4,0$; Normal= $3,9 \pm 0,46$). Ainda, no 11º dia, observou-se leucocitose, à custa de neutrofilia e linfomonocitose (Valores normais: Leucócitos totais (LT)=



7,430±0,5247; Neutrófilos (N)= 2,009±0,3164; Mononucleares (MN)= 5,476±0,4001; API: LT= 16,39±2,281; N= 4,472±1,220; MN= 12,12±2,109), redução de 57,1% de peso corporal, devido à manipulação do animal, sem alterações nos índices renal, hepático e esplênico. Esses aspectos, em conjunto, explicitam que tal modelo animal de reabsorção óssea alveolar é, sobretudo, um modelo de indução de resposta inflamatória, que pode, conforme o curso temporal da doença, resultar em perda óssea facilmente mensurável. Logo, nesse contexto, os 11 dias de administração da PLCp (1,0 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) a ROA em 26%, quando comparada às hemimaxilas não tratadas (API= 4,73±0,42; PLCp 1 mg/kg= 3,51±0,29). Considerando-se que a PLCp reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (FREITAS *et al.*, 2012), e que o mecanismo de reabsorção óssea associada à periodontite consiste no aumento destas citocinas, sugere-se que tal redução se deveu ao potencial anti-inflamatório de PLCp. Apoiando tais achados, à avaliação histológica da região entre 1^o e 2^o molares, a PLCp (1,0 mg/kg) reduziu o infiltrado leucocitário, não obstante a redução das reabsorções óssea e cementária {API=[3 (2-3)]; PLCp 1 mg/kg=[1 (1-2)]; $p < 0,05$ }. Entretanto, seu efeito a nível de furca não foi significativo, o que pareceu coerente com o grau moderado de proteção que a PLCp conferiu à estrutura óssea *per si*. Por outro lado, ao se avaliar a MPO, considerada um importante marcador neutrofílico, a PLCp preveniu significativamente o aumento da atividade de enzima (API= 16,208±3,639; PLCp 1 mg/kg= 12,930±0,919). Tal achado sugere que, ao menos em parte, o efeito da PLCp nesse modelo animal está relacionada ao menor infiltrado neutrofílico subjacente à ligadura. De fato, ao se avaliar seu papel a nível de anabolismo ósseo, a PLCp reduziu, de forma significativa, os níveis de FAO, um marcador relativamente específico da osteogênese e um marcador indireto da atividade de osteoblastos (COLEMAN *et al.*, 2008). Sabe-se que a indução da periodontite através da ligadura do segundo molar superior causa uma diminuição dos níveis séricos de FAO, quando comparados aos níveis basais (GOES *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016). Nesse caso, a redução da FAO, aquém dos níveis induzidos nesse modelo, reforça que a redução da ROA provavelmente não está relacionada ao aumento da atividade osteoblástica, mas sim ao seu potencial anti-inflamatório *in loco*. Quanto aos demais parâmetros sistêmicos, mesmo as maiores doses utilizadas da PLCp não causaram alterações no leucograma, não prevenindo assim a leucocitose, a neutrofilia ou a linfomonocitose induzidas pelos 11 dias de ligadura. Ainda, nesse modelo, a PLCp não modificou os índices renal, hepático e esplênico, o a variação de massa corpórea, explicitando que a sua utilização no referido período não afetou os padrões de



normalidades sistêmica e, portanto, sua segurança.

Conclusão

A fração proteica não dialisável do látex de *Calotropis procera* reduziu a infiltração neutrofílica gengival relacionada à reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura, sem efeitos anabólicos ósseos ou sistêmicos importantes.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 110935/2016-0 e CNPq/PIBIC-UFC); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI) e Fundação Cearense de Apoio Científico e Tecnológico (FUNCAP/CNPq-Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX: PR2-0101-00054.01.00/15). Os autores declaram não haver conflitos de interesse neste trabalho.

Referências

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. Inflamm Res, v.55, n.12, p.559-564, 2006.

ALJEHANI, Y. A. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. International Journal of Dentistry, v.2014, 2014.

ALMEIDA, R. F.; PINHO, M. M.; LIMA, C.; FARIA, I.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. Rev Port Clin Geral, v.22, p.379-390, 2006.

AL-QARAWY, A. A.; MAHMOUD, O. H.; SOBAIH, HAROUN, E. M.; ADAM, S. E. A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. Vet Res Commun, v.25, n.1, p.61-70, 2001.

ARAÚJO, V. M. A.; MELO, I. M.; LIMA, V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. Mediators of Inflammation, v.2015, 2015.

ARYA, S.; KUMAR, V; L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. Mediators of Inflammation,



v.2005, n.4, p.228-232, 2005.

BARTOLD, P. M.; CANTLEY, M. D.; HAYNES, D. R. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. Periodontol 2000., v.53, p. 55-69, 2010.

BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GURGAN, C.; SORSA, T.; RONTTINEN, Y. T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. J Dent Res, v.86, n.4, p.347-351, 2007.

BEZERRA, M.M.; LIMA, V.; ALENCAR, V.B.M.; VIEIRA, I.B.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A.C. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol, v.71, n.6, p.1009-14, 2000.

COLEMAN, R.; BROWN, J.; TERPOS, E.; LIPTON, A.; SMITH, M. R.; COOK, R.; MAJOR, P. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. Cancer Treat Rev, v.34, n.7, p.629-639, 2008.

FREITAS, A. P.; BITENCOURT, F. S.; BRITO, G. A.; DE ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; RAMOS, M. V.; VALE, M. L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.385, n.10, p.981-990, 2012.

FREITAS, C. D.; LOPES, J. L.; BELTRAMINI, L. M.; DE OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA, J. T.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. Biochim Biophys Acta, v.1808, n.10, p.2501-2507, 2011.

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M.; BENEVIDES, N. M.; ALENCAR, N.M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res, v.49, n.1, p.45-54, 2014.

GOES, P.; LIMA, A. P.; MELO, I. M.; REGO, R.O; LIMA, V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. Braz Dent J, v.21, n.3, p.193-198, 2010.

GUIMARÃES, M. V.; MELO, I. M.; ADRIANO ARAÚJO, V. M; TANAZOA WONG, D. V.; RORIZ FONTELES, C. S.; MOREIRA LEAL, L. K. A.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Dry extract of *Matricaria recutita* L. (Chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . J Periodontol, v.87, n.6, p.706-15, 2016.

LIMA, V.; VIDAL, F.D.; ROCHA, F.A., BRITO, GA.; RIBEIRO, R.A. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. J Periodontol, v.75, n.1, p.162-168, 2004.

REDLICH, k.; SMOLEN, J.S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. Nat Rev Drug Discov, v.11, n.3, p.234-50, 2012.