

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE *POLYGALA
PANICULATA* NA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS**

Florianópolis

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE *POLYGALA*
PANICULATA NA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS**

Projeto para Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para
a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Aluno: Gustavo Barreto de Oliveira

Orientador: Professor. Dr. Rubens Rodrigues Filho

Florianópolis

2014

Gustavo Barreto de Oliveira

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM EXTRATO DE *POLYGALA PANICULATA* NA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, xxx maio de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr. Rubens Rodrigues Filho

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Isis Carvalho Encarnação

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Adair Roberto dos Santos

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho:

Ao meu pai Jucemar, minha mãe Rosimere e meu irmão Filipe, que um dia sonharam e hoje compartilham este importante momento comigo, sem eles este sonho nunca poderia ser cumprido.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força e determinação para superar todos os obstáculos que apareceram no caminho, e me fez concluir mais uma etapa da minha vida.

A esta universidade, sua estrutura disponível, seu corpo docente e todos que de alguma forma me ajudaram no dia a dia de pesquisa com novos ensinamentos e companheirismo.

Aos colegas de pesquisa Julia Gabriela Dietrichkeit Pereira, Camila Rodrigues, Raí Heindenreich e, Ana Beatriz Khoury pela ajuda mútua durante toda a fase de trabalhos clínicos.

A Doutoranda Isis Carvalho Encarnação pelo apoio e ensinamentos dado durante toda a pesquisa.

Ao meu orientador Rubens Rodrigues Filho, pelo tempo, paciência e empenho dedicado à elaboração deste trabalho, mostrando em todo tempo ser receptivo e atencioso.

Aos animais utilizados na pesquisa, que nos deram a vida em busca de novos ensinamentos e descobertas.

Aos meus amigos que de certa forma passaram por mim colaborando com boas experiências e ajuda durante toda a faculdade.

A minha família que esteve comigo durante todo o tempo me auxiliando nas horas mais difíceis, mantendo-me focado através de uma base estrutural e união.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

A doença periodontal é uma doença inflamatória com grande prevalência em adultos, caracterizada por uma infecção bacteriana crônica presente na estrutura de suporte dos dentes, levando a perda dos mesmos. O objetivo deste trabalho foi estudar a efetividade do extrato hidroalcolico da planta *Polygala paniculata* (EHPP), com potencial anti-inflamatório, na doença periodontal em ratos. A doença periodontal foi feita através de uma ligadura adaptada no segundo molar direito dos maxilares de ratos machos Wistar (n=32), que permaneceu por 7 dias. Após esse tempo os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 8 animais em cada grupo, os grupos receberam uma dose específica do extrato da planta *Polygala paniculata*. Um grupo de 3 animais sem indução periodontal e sem a administração do fármaco, foi usado como grupo controle. De acordo com o tratamento, o grupo 1 recebeu o extrato na dose de 10 mg/kg de peso, no grupo 2 foi administrado 1 mg/kg, e no grupo 3 administramos 0,1 mg/kg de peso corporal e no grupo 4 cada animal recebeu 10% do seu peso em salina, representando o grupo controle. Um quinto grupo (n=3) foi formado por animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção. Posteriormente à eutanásia as amostras foram colhidas e foi realizada a radiografia dos maxilares dos animais. As imagens foram digitalizadas e avaliadas no programa Image J para medir a distância entre a crista óssea alveolar e o ponto de contato. A análise estatística mostrou que O EHPP inibiu a perda óssea de maneira significativa na face Mesial quando administrada nas doses de 1mg/Kg e 10 mg/Kg, porém tal efeito não foi observado na face Distal, embora passamos a observar que houve redução através do gráfico na perda óssea com tendência a significância estatística na dose de 10 mg/Kg. Em síntese, os dados obtidos mostram que o EHPP foi efetivo, pelo menos em parte, na doença periodontal, sugerindo a continuidade dos estudos da planta de uma forma mais efetiva e abrangente futuramente e assim poderá ser uma possível forma de tratamento.

Palavras-chave: *Polygala paniculata*, doença periodontal, perda óssea.

ABSTRACT

Periodontal disease is an inflammatory disease with high prevalence in adults, characterized by a chronic bacterial infection in the structure supporting the teeth, leading to impairment. The aim of this work was to study the effectiveness of the hydroalcoholic extract of *Polygala paniculata* (EHPP) plant with anti-inflammatory potential, in periodontal disease in rats. Periodontal disease was made by a bandage adapted at right second maxillary molar of male Wistar rats (n = 32) who remained for 7 days. After this time the animals were randomly divided into 4 groups of 8 animals in each group, the groups received a specific dose of the extract of the plant *Polygala paniculata*. A group of 3 animals with and without periodontal drug delivery, induction was used as a control group. According to the treatment, one group received the extract at a dose of 10 mg / kg body weight in Group 2 were administered 1 mg / kg and group 3 administer 0.1 mg / kg body weight, and in group 4 each animal received 10% of their weight in salt, representing the control group. A fifth group (n = 3) included animals that were not subjected to any intervention. Later euthanasia samples were harvested and radiography of the jaws of the animals was performed. The images were scanned and evaluated in Image J software to measure the distance between the bone crest and the contact point. Statistical analysis showed that the EHPP inhibited bone loss significantly in Mesial face when administered at doses of 1mg/kg and 10 mg / kg, but this effect was not observed in the Distal face, although we note that there was a reduction by graphic bone loss with a tendency to statistical significance at a dose of 10 mg / kg. In summary, our data show that the EHPP was effective, at least in part, in periodontal disease, suggesting continuing studies of a more effective and comprehensive manner in future plant and thus may be a possible treatment

Keywords :*Polygala paniculata*, periodontal disease, bone boss.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A.....Luxação com sonda lado Mesial
- Figura1. B.....Luxação com sonda lado distal
- Figura 2. A.....Inserção do fio de algodão
- Figura 2. B.....Ligadura em posição
- Figura 3. A.....Fio em posição após 7 dias
- Figura 3.B.....Segundo molar após remoção do fio
- Figura 4.....Imagem radiográfica da maxila pós tratamento
- Figura 5.....Efeitos induzidos pelo tratamento (15 dias) com diferentes concentrações de *P. paniculata*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.....	COBEA
Comitê de Ética no Uso de Animais.....	CEUA
Extrato Hidroalcolico de <i>Poligala Paniculata Linneu</i>	EHPP
Fator de necrose tumoral alfa.....	TNF alfa
Fosfolipase A2.....	PLA-2
Interleucina1.....	IL-1
Interleucina1beta	IL-1B
Interleucina6.....	IL-6
Metaloproteinase de matriz 9.....	MM-9
Moléculade sinalização da perda óssea.....	RANK /RANKL
Osteoprotegerinas.....	OPG
Óxido nítrico.....	NO
Prostaglandina E2	PG- E2

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais	21
4.2 Procedimento para indução da doença periodontal.....	21
4.3 Grupos experimentais.....	23
4.4 Drogas usadas.....	24
4.5 Obtenção das peças para análise radiográfica	24
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO.....	29
8. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma patologia multifatorial com maior prevalência de perda dental em adultos em todo o mundo (GARCIA et al, 2011), agindo de forma a levar a destruição local com degradação do ligamento periodontal através de micro-organismos patogênicos presentes no sulco gengival. Portanto, é causada por micro-organismos específicos, com formação de bolsa, perda óssea e retração gengival (CARRANZA et al, 2007).

Segundo Carranza *et al.* (2007), o tecido gengival sadio está em homeostase quando mantém o equilíbrio hospedeiro-bactéria, isso acontece devido a fatores específicos de cada tecido que compõe o epitélio gengival. Essa especificidade pode ser analisada através do epitélio gengival oral, apresentando um tecido ceratinizado ou paraceratinizado, epitélio sulcular, agindo como membrana semipermeável e epitélio juncional, apresentando infiltrado de neutrófilos como barreira.

A sustentação do tecido gengival se faz através do processo alveolar, formando maxila e mandíbula, suportando o alvéolo dentário, sendo a base para uma boa inserção dental com o auxílio do ligamento periodontal. A remodelação e renovação acontece no decorrer da vida, através de duas linhagens celulares, osteoblastos, na formação e osteoclastos, na reabsorção óssea. Em condições fisiológicas, observa-se o equilíbrio de forma sincronizada, onde a reabsorção age junto com a formação, mantendo a estabilidade óssea (LHINDE et al, 2005).

Atuando com o propósito de equilibrar as forças que incidem sobre os dentes, o ligamento periodontal age de forma a dissipar estas forças para o osso alveolar, evitando algum trauma maior. Inserindo-se no cemento e osso alveolar, possui células tronco indiferenciadas com capacidade de se transformar em osteoblastos, osteoclastos ou cementoclastos, dependendo do momento. Também possui suprimento vascular onde ocorre anastomose com o osso alveolar, importante para a irrigação sanguínea, e também serve como via de acesso de células inflamatórias para o local (CARRANZA et al, 2007).

A partir do momento em que se perde a estabilidade entre hospedeiro-bactéria ocorre a proliferação e formação do calculo dental, primeiramente aeróbios e

posteriormente anaeróbios através da proliferação e formação de biofilme bacteriano, passando posterior a placa bacteriana e por ultimo a formação do calculo dental e conforme baixa os níveis de O₂, aumentando o número de anaeróbios e a patogenicidade bacteriana. (LINDHE et al, 2005). Através de produtos como colagenase, hialuronidase, protease, entre outros, as bactérias causam danos às células do epitélio, tecido conjuntivo e constituinte intercelular, como colágeno, substância fundamental e glicocálice. Assim, a presença de espessamento, devido aos produtos liberados entre as células, permite que agentes deletérios ou as próprias bactérias ultrapassem e acessem o espaço conjuntivo (CARRANZA et al, 2007).

Esses produtos fazem com que haja aumento do número de células do processo inflamatório, tais como macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos e células vasculares que juntas atuarão expressando citocinas com atividades pró-inflamatórias. Tais citocinas caracterizam-se por ser do tipo interleucinas, com a IL-1, IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF-alfa), e as prostaglandinas E₂ (KELLES et al, 2005).

A presença de células bacterianas e a liberação de colagenases por fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, fazem com que haja a degeneração do tecido circundante e das fibras periodontais, causando o descontrole da lesão. A evolução leva ao edema e perda da adesividade do epitélio juncional, ocorrendo a migração apical do fundo de sulco. O desenvolvimento caracteriza-se pela migração de linfócitos, passando assim a um estágio mais crônico e intermitente, apresentando graus variados de degeneração e necrose, mantendo-se num mecanismo de “feedback”, onde não se tem mais controle devido as citocinas que estão sendo liberadas, caracterizando a doença periodontal (CARRANZA et al, 2007).

Atualmente, objetiva-se buscar formas de tratamentos para a doença periodontal que podem ser tanto curativas como preventivas, isso através de vários métodos de indução de lesão periodontal, utilização de fármacos como antibióticos (FERNANDES et al, 2010), bisfosfonatos (ALENCAR et al, 2002), anti-inflamatórios e fitoterápicos (MEOTTI et al, 2013), entre outros.

Sabendo-se que os fármacos fitoterápicos vêm ao longo dos anos mostrando resultados satisfatórios no tratamento da inflamação, o presente trabalho tem como

objetivo avaliar a influência da administração do extrato de *Polygala paniculata* sobre os danos resultantes da doença periodontal induzida experimentalmente em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A doença periodontal é uma doença que se apresenta de forma sistêmica na população, porém, devido ao fato de ser difícil de estudar em humanos, levou pesquisadores a utilizar modelos experimentais desenvolvidos em ratos para suas análises. Através de variadas pesquisas com as mais diversas especificações farmacológicas objetivou-se a regressão da doença periodontal ou até mesmo sua cura.

Alencar *et al* (2002) realizou uma pesquisa onde utilizou clodronato de sódio (bis-fosfonato) na tentativa de tratar a doença periodontal induzida em 72 ratos Wistar. A pesquisa transcorreu tanto de forma curativa como preventiva com concentrações de 1; 5 e 25 mg/kg em 5 grupos de 6 animais. A forma preventiva ocorreu através do método profilático com dois grupos, um grupo recebendo fármaco e outro, salina com administrações a partir de 1 hora antes do momento zero da indução até o 5º dia de ocorrência da doença periodontal. O método curativo também ocorreu com dois grupos, um recebendo salina e o outro recebendo fármaco com administrações a partir do 5º dia após a remoção do fio até o 11º dia e, mais um grupo onde nenhuma indução da doença ou administração de fármaco foi feito. Constatou-se a partir da pesquisa que os resultados do grupo profilático reduziram 25%, 61% e 75% comparado com o grupo não tratado, já o grupo curativo reduziu 20%, 62% e 69% em relação ao grupo não tratado, seguindo a ordem de 1; 5 e 25mg de administração do fármaco. Assim mostrou-se a melhor eficácia do método profilático em relação ao curativo, porém as duas formas apresentaram resultados satisfatórios.

A eficácia do clodronato de sódio se deu devido ao fato de este atuar na diminuição da resposta inflamatória, inibindo a reabsorção óssea alveolar ao redor dos dentes, com diminuição da atividade de osteoclastos. O clodronato de sódio diminui a resposta de mediadores inflamatórios como TNF alfa, IL-1 e, também, inibe a diferenciação de células mononucleares de defesa, levando a diminuição das citocinas presentes e, conseqüentemente redução do edema e da inflamação.

Fernandes *et al* (2010) utilizaram antibiótico de forma curativa na doença periodontal, através da administração de cloridrato de tetraciclina administrada

diretamente na bolsa periodontal. Este medicamento além de apresentar atividade antimicrobiana, também mostrou forte adsorção pela superfície radicular, sendo liberada posteriormente na sua forma ativa, levando a um maior tempo de atuação na bolsa periodontal. Além disso, outros estudos têm demonstrado inibição de colágenases e da função osteoclástica, estimulando a formação osteoblástica e regulando a angiogênese, quando associada à estrutura radicular. A pesquisa ocorreu através da indução periodontal em 60 animais por 7 dias com uso de fio. Os animais foram separados posteriormente em dois grupos de 30 animais, onde cada grupo recebeu como tratamento raspagem e alisamento radicular. Sequencialmente o grupo controle recebeu 1ml de salina, e o grupo tratado recebeu irrigação de 1mL de cloridrato de tetraciclina. Os animais foram sacrificados 7, 15 e 30 dias após. A análise histológica revelou no grupo controle o aumento do número de neutrófilos em degeneração, principalmente nos tempos de 7 e 15 dias. Finas trabéculas ósseas e áreas de reabsorção óssea foram observadas, porém, no grupo tratado o ligamento apresentou-se intacto, organizado, com fibras colágenas paralelas, não mostrando infiltrado inflamatório e não havendo mudança no cemento nos 3 tempos analisados.

Assim a administração de cloridrato de tetraciclina no grupo tratado parece ter mantido a estabilidade do osso alveolar quando comparado ao grupo controle. Sugeriu-se também, atividade anti-inflamatória, através da inibição de neutrófilos e prejuízo na síntese de prostaglandina E2 através da inibição da fosfolipase A2, obtendo assim, colonização de fibroblastos aderidos ao dente. Outro dado importante foi a inibição da perda óssea devido a inibição da atividade de colagenases e modificação do efeito osteoclástico.

Branco de Almeida *et al* (2012), pesquisou a doença periodontal induzida e o seu possível tratamento pela administração de fluoxetina, um antidepressivo que tem demonstrado atividade analgésica, imuno moduladora e, também anti-inflamatória, através da indução periodontal em 30 animais divididos em 3 grupos de 10 animais. O grupo 1 caracterizou-se por animais controle, sem indução da doença, no grupo 2, os animais receberam a ligadura e a solução salina pelo método de gavagem, e o grupo 3, onde os animais receberam 20 mg/kg/dia de fluoxetina diluída em solução salina

administrada pelo uso da sonda oral. A administração foi iniciada uma hora antes da indução da doença e mantida até a eutanásia dos animais que ocorreu 3 ou 15 dias após. Com análises histológicas foi possível sugerir que a fluoxetina conseguiu suprimir a resposta inflamatória, com níveis de interleucina-1 e prostaglandina E2 menores em relação ao grupo induzido com fio mais a administração de placebo. Este resultado sugere que a fluoxetina protegeu a estrutura óssea contra a reabsorção, e também, preservou as fibras colágenas. O grupo com fio mais placebo também apresentou níveis mais altos de Interleucina-1, MMP-9 e óxido nítrico quando comparado ao grupo 2.

Outro grupo de fármacos que também está sendo muito pesquisado ultimamente são os fitoterápicos, apresentando resultados satisfatórios, abrindo novos horizontes para outras pesquisas. Duang *et al* (2012) apresentou resultados do combate a doença periodontal pelo uso da *mangyfera*, um glicosilxantóide fitoterápico, que possui várias propriedades como anti-oxidante, antidiabético, imunomodulador e principalmente anti-inflamatório. Como a doença periodontal evolui através de mediadores da inflamação liberados constantemente em níveis excessivos, este atuará diretamente nessa cascata de sinalização intracelular como também na inibição de espécies reativas de oxigênio.

Como a progressão da doença periodontal que atua no sistema imunológico, mas também no aumento de radicais de oxigênio reativos, a *mangyfera* através da quelação do ferro inibe a reação fenton, prevenindo a peroxidação lipídica, protegendo a perda de potencial da membrana mitocondrial, e assim, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio. Outra via em que se observou atuação da planta foi na inibição de endoperóxido de prostaglandina sintase 2, sendo que esta é predominantemente expressa em reações inflamatórias. Atuando na ativação de outras isoformas de prostaglandinas, inibe o aumento do fluxo sanguíneo local, a maior permeabilidade capilar e a migração celular. Sendo assim, a administração de *mangyfera* mostrou-se ser um importante fitoterápico no controle da inflamação causada pela doença periodontal.

Carmona *et al* (2013), avaliou o efeito do óleo de andiroba na doença periodontal induzida em ratos. O óleo de andiroba possui destaque na Amazônia, sendo atribuídas propriedades anti-inflamatórias por pessoas locais e comprovadas cientificamente. Através de uma pesquisa realizada em 15 ratos Wistar, foi induzida uma doença periodontal por 50 dias com o uso de fio adaptado ao redor do segundo molar superior. Os animais foram posteriormente divididos em 3 grupos de 5, recebendo 3 tipos de medicamentos 1 vez ao dia por sete dias administrados pelo método de gavagem. O grupo 1 (controle) recebeu salina 0,63mL/kg, grupo 2 (andiroba) 0,63 mL/kg de óleo de andiroba e o grupo 3 (meloxicam) 7,5 mL/kg de meloxicam. Através de análise histológica foi possível observar que tanto óleo de andiroba quanto o fármaco meloxicam apresentaram resultados satisfatórios em relação à salina pela inibição do número de células inflamatórias presentes na lesão, reduzindo assim a resposta inflamatória. Porém em relação a perda óssea, importante parâmetro na cura da lesão periodontal, o óleo de andiroba não induziu alterações significativas quando comparado aos outros dois grupos, sugerido assim mais análises.

Botelho *et al* (2013) tentou tratar a doença periodontal através do uso de duas plantas com propriedades fitoterápicas, a *Lippia sidoides*, com propriedades antimicrobianas e a *Myracrodruon urundeuva*, com propriedades anti-inflamatórias. As duas plantas foram homogeneizadas ou administradas separadamente por via oral na forma de gel. Foram utilizados 144 ratos Wistar divididos em 6 grupos: controle, onde não houve indução periodontal ou administração do gel; grupo submetido à doença sem nenhum tratamento; grupo induzido e tratado com salina em gel; grupo induzido e tratado com *Lippia sidoides* 0,5%; grupo induzido e tratado com *Myracrodruon urundeuva* 5%; grupo induzido e tratado com as duas plantas em conjunto e grupo induzido e tratado com minociclina à 10% à base de gel. O tratamento iniciou imediatamente após a cirurgia com 3 administrações diárias e parou quando os animais foram sacrificados no 11^o dia. Observou-se que o tratamento feito com o uso conjunto das plantas diminuiu o número de citocinas, TNF-alfa e IL-1B quando comparado ao grupo não tratado ou com o grupo tratado apenas com salina em gel. Outro dado apresentado foi que os fármacos tanto administrados juntos quanto separados, e o fármaco doxiciclina inibiram o crescimento bacteriano periodontal e a

perda de peso dos animais. Como TNF estimula eicosanóides e outras citocinas, a apresentação de níveis diminuídos desta, fez diminuir concomitantemente outras citocinas como IL-1, TNF-alfa e, também, células inflamatórias induzidas por IL-1 como macrófagos e neutrófilos, não liberando oxigênio reativo evitando perda óssea alveolar.

Fechando a abordagem relacionada aos fármacos fitoterápicos utilizados mais recentemente em pesquisas envolvendo o processo inflamatório, a pesquisa realizada por Napimoga *et al* (2009) induziu a doença periodontal em animais. Tentou-se tratar a doença com cannabidiol, um composto da *Cannabis sativa*, não induzindo efeitos psicotomiméticos e possuindo propriedades anti-inflamatórias. Esta classe de fármacos atua sobre receptores específicos de canabinóides que foi preparada a partir da diluição de cannabidiol em salina e 2% de tween 80. A pesquisa foi feita com 30 ratos Wistar divididos em 3 grupos com 10 animais cada, onde o primeiro grupo foi composto por animais sem a colocação do fio e sem a administração do fármaco. O grupo 2 com inserção da ligadura e administração de um veículo e o grupo 3 com inserção de ligadura e administração de cannabidiol 5mg/ kg. Os animais receberam a administração de veículo ou cannabidiol durante toda a pesquisa que perdurou por 30 dias, após esse tempo os animais foram sacrificados. Através de análises histológicas foi observado que cannabidiol atuou na inibição da perda óssea quando comparado com os grupos controle, o grupo induzido e o grupo tratado com veículo. O Cannabidiol também induziu diminuição do número de moléculas relacionadas à modulação de osteoclastos, RANK e RANKL e receptores presentes em osteoblastos como as osteoprotegerinas (OGP), receptores com função de diferenciação e proliferação de osteoclastos, fazendo-se presentes também em fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal e células T ativadas. Esses mediadores apresentaram-se em maior quantidade nos animais onde houve uma doença periodontal induzida e tratamento com veículos. Também mostrou efetividade sobre neutrófilos através de mediadores quimiotáticos, e, moléculas pró-inflamatórias como IL-1beta e TNF-alfa, esse mecanismo fez com que mediadores não fossem estimulados devido aos baixos níveis de quimiocinas e citocinas, e assim levando a diminuição da inflamação e perda óssea. Com isso, pode-se dizer que cannabidiol apresentou propriedades

antiinflamatórias importantes, tanto na inibição de citocinas como na modulação da resposta do hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar a influência da administração do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* sobre a doença periodontal induzida em ratos.

3.2 Objetivos específicos:

- Induzir a doença periodontal em ratos.
- Quantificar pelo uso da radiografia periapical a extensão da perda óssea na doença periodontal induzida em ratos.
- Avaliar se a administração do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* é efetiva no tratamento da doença periodontal em ratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste experimento foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tiveram sua aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo nº PP00475). O presente trabalho fez parte de um projeto maior e foi desenvolvido no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 3 meses e peso médio de 350g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h, (luz após as 7:00 horas) e com livre acesso a água e comida.

4.2 Procedimento para a indução da doença periodontal

Os animais foram anestesiados para indução da doença periodontal com injeção intraperitoneal de 90mg/Kg de peso corporal de cloridrato de ketamina e 20mg/Kg por peso corporal de cloridrato de xilazina. A indução da doença periodontal foi obtida através da luxação e introdução de ligadura no espaço sub-gengival (fio de algodão 10.0). Depois de colocado o fio foram feitos dois nós na face vestibular do dente (Fig. 1 e 2).

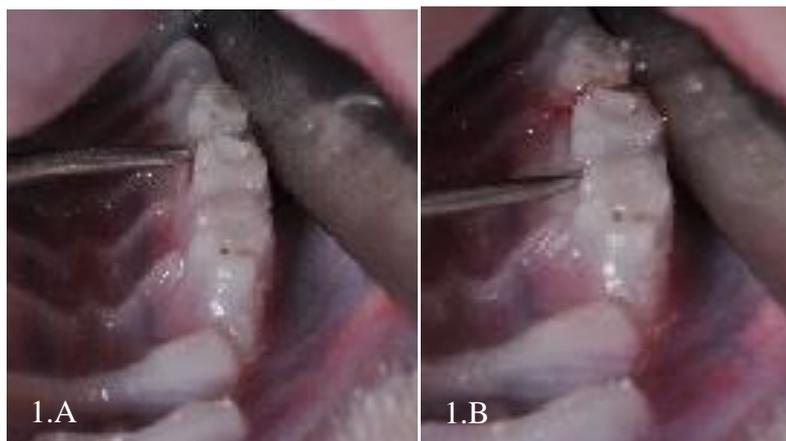


Fig. 1: (A e B) Luxação com sonda exploradora n°5 na face distal do segundo molar superior realizado antes da introdução do fio de algodão 10.0.

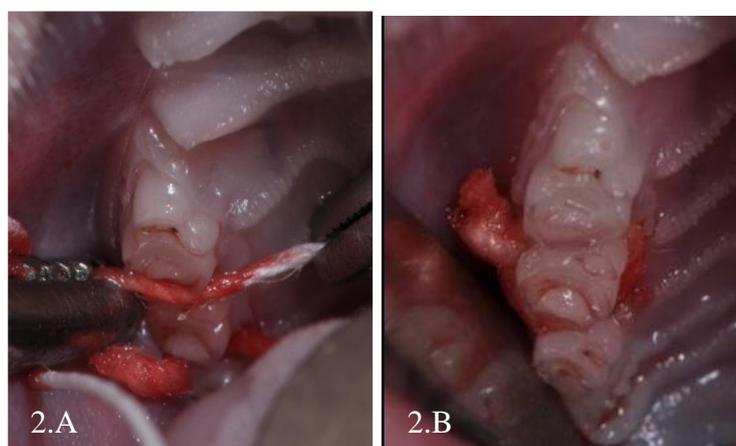


Fig. 2: (A) Inserção do fio de algodão linha 10.0 com pinça anatômica nos lados mesial e distal do dente luxado. (B) Ligadura em posição com dois nós pela face vestibular.

O fio permaneceu por sete dias, tempo necessário para que se observe o estabelecimento da doença periodontal. Após esse tempo, os animais foram novamente anestesiados e a ligadura removida do meio intrasulcular com o auxílio de uma sonda periodontal, uma tesoura Goldman foi utilizada para cortar o fio e uma pinça anatômica para removê-lo do meio intrabucal (Fig. 3).

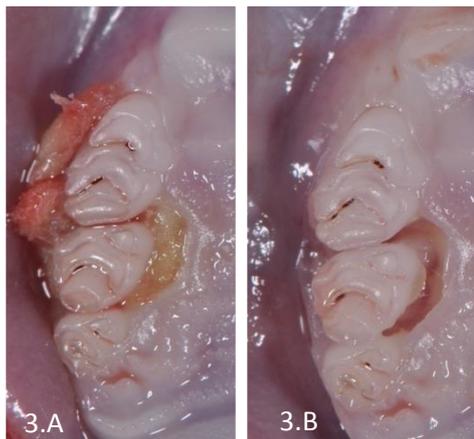


Fig.3: (A) Fio em posição após 7 dias da indução da doença periodontal. (B) Região do segundo molar superior após a remoção da ligadura.

A raspagem periodontal foi realizada para simular o efeito do tratamento clínico logo após a remoção do fio, onde foi feito o uso de curetas Hu-friedy 1 e 2 para que houvesse uma desagregação da placa bacteriana, possibilitando assim a atuação do fármaco. O procedimento foi realizado nas faces palatal e vestibular do dente acometido pela doença periodontal, seguindo a direção disto mesial numa sequência de 10 vezes cada lado. Após a remoção do fio foi possível observar pelo aspecto visual que a gengiva apresentava edemaciada, com coloração avermelhada com sangramento após a remoção do fio e uma mobilidade dental.

4.3 Grupos experimentais

Após a indução periodontal, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (8 animais/grupo), onde cada grupo recebeu uma dose específica do extrato da planta *Polygalapaniculata*. Um grupo de 3 animais foi formado, porém sem indução periodontal e sem a administração do fármaco, caracterizando-se como grupo Naive. De acordo com o tratamento, o grupo 1 recebeu o extrato na dose de 10 mg/kg peso, no grupo 2 foi administrado 1 mg/kg peso, o grupo 3, 0,1 mg/kg peso, no grupo 4 cada animal recebeu 10% do seu peso em salina e no grupo 5 os animais não foram submetidos a nenhuma intervenção.

4.4 Drogas usadas

A administração do Extrato Hidroalcoólico de *Polygala paniculata* foi iniciada após a remoção do fio e mantida por 15 dias, sendo realizadas duas vezes ao dia. A primeira administração do fármaco foi às 08 h e a segunda às 17 h. O fármaco foi administrado por gavagem (via oral) através de uma seringa plástica de 1 ml com ponta Luer, inserindo o fármaco diretamente no esôfago para que não houvesse regurgitação.

4.5 Obtenção das peças par análise radiográfica

Após 15 dias de tratamento com o fármaco, os animais foram sacrificados por overdose de Hidrato de Cloral a 7%, administrado por via intramuscular. Posteriormente com o auxílio de uma tesoura foi feita a dissecação dos tecidos para possibilitar o corte dos tecidos ósseo e cartilaginoso da maxila, os quais foram mantidos por 48 horas em paraformoldeído 10% e posteriormente em álcool 70% até o momento da tomada radiográfica.

A tomada radiográfica foi realizada de forma padronizada. Um batente em cera de forma trapezoidal foi usado para a fixação da peça, mantendo uma distância de 10 cm entre o filme (Kodak 41 mm por 31mm) e o aparelho raio X da Universidade Federal de Santa Catarina.

Após a revelação, cada filme radiográfico foi encartelado para ser fotografado e analisado no computador através do programa Image J, quantificando-se a perda óssea de cada grupo. A distância entre o ponto de contato e a altura da crista do osso alveolar foi determinada para a raiz mesial e distal por um software previamente calibrado. Cada mensuração de perda óssea de cada radiografia foi repetida 3 vezes pelo mesmo examinador, em dias diferentes, para reduzir a variação dos dados.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram tabulados e submetidos ao teste de Análise de Variância de duas vias (ANOVA two-way), com nível de significância de 5%.

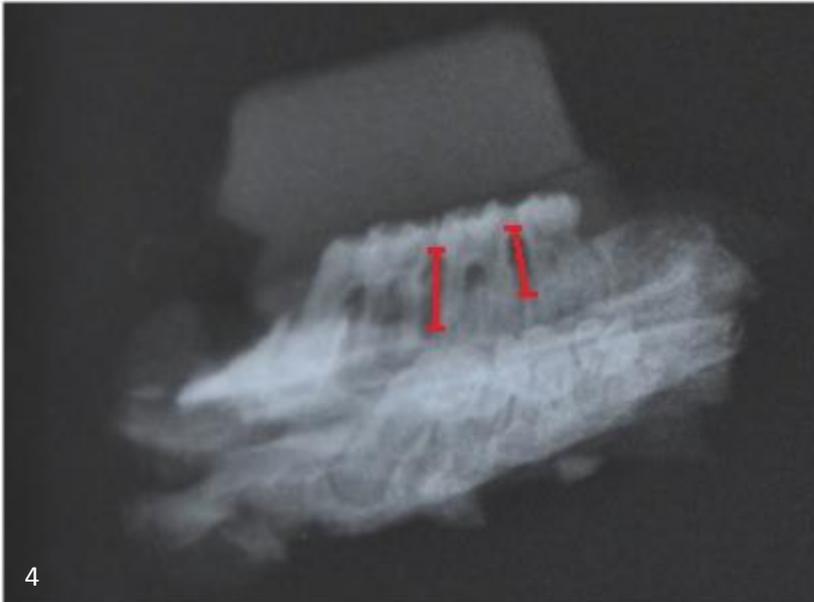


Fig.4. Imagem radiográfica de maxila pós-tratamento, utilizada para mensuração da perda óssea mesial e distal do segundo molar superior direito.

5. RESULTADOS

Os dados obtidos e representados na fig. 5 demonstram que a doença periodontal foi induzida e determinou uma perda óssea significativa no grupo controle tanto mesial como distal. O tratamento com *P. paniculata* inibiu a perda óssea de maneira significativa na face mesial (A) quando foi administrada nas doses de 1 mg/Kg e 10 mg/Kg porém, tal efeito não foi observado na face distal (B) muito embora possamos observar que houve uma redução na perda óssea com tendência a significância estatística na dose de 10 mg/Kg.

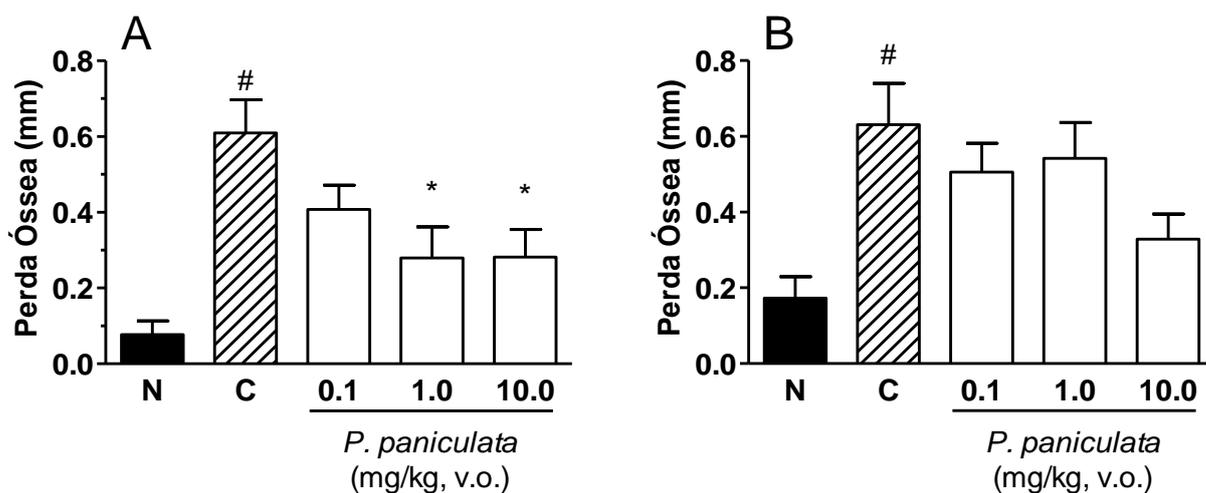


Fig5. Efeitos induzidos pelo tratamento (15 dias) com diferentes concentrações de *P. paniculata*, administrada duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 hs) pelo método da gavagem, na perda óssea causada pela doença periodontal induzida em ratos. (A) representa a face mesial e (B) a face distal do segundo molar superior direito. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. (A e B). # $P < 0,05$ em relação ao grupo naïve (N); * $P < 0,05$ em relação ao grupo controla (C).

6. DISCUSSÃO

As pesquisas com o extrato da planta *P. paniculata* estão demonstrando ser de grande valia e interesse para pesquisas futuras. Isso se dá não somente pelos resultados obtidos no presente estudo, mas também por resultados obtidos em pesquisas anteriores pelo seu efeito antiinflamatório anti nociceptivo e protetor gástrico e pela facilidade com que esta planta é encontrada em todo o estado de Santa Catarina, apresentando em sua família aproximadamente umas 500 espécies (LAPA *et al* 2009).

Os resultados obtidos por Lapa *et al* (2007), demonstraram que a administração de *P. paniculata* reduziu a incidência de úlceras gástricas com a manutenção e produção de muco, quando extrato foi administrado por via oral e intraperitoneal demonstrando também propriedades anti-inflamatórias e de indução da reparação tecidual. Foram obtidos resultados satisfatórios em testes para avaliar a dor por estímulos térmicos e químicos, exaltando sua atuação nas citocinas e receptores químicos (LAPA *et al* 2007). Em outro estudo, foi obtida inibição glutamatérgica e das vias dependentes de citocinas pró inflamatórias pela administração de extrato de *P. sabulosa*, uma outra planta da família (RIBAS *et al* 2008).

Assim, como nos trabalhos citados, nesta pesquisa a *P. paniculata* induziu resultados satisfatórios sobre a doença periodontal induzida em ratos. Como já descrito na literatura a doença periodontal provoca perda óssea que leva a perda dos dentes. A administração do extrato de *P. paniculata* reduziu de modo significativo a perda óssea na face mesial do molar. A ausência de resultado significativo na face distal pode ser justificado pela diferença que existe na altura da crista óssea entre as faces mesial e distal e pelo fato da perda óssea não ser uniforme, sendo que na face distal a crista óssea é mais elevada do que na face mesial. Além disso, devemos ressaltar que a avaliação da perda óssea por radiografias periapicais, não constituem um método de fácil execução, pois, as medidas são milimétricas e qualquer descuido pode levar a resultados falsos, positivo ou negativo. Porém o raio-X periapical é o método de avaliação mais semelhante ao tratamento clínico do paciente e metodologias mais precisas como

tomografia computadorizada constituem-se ainda como um alto custo para se obter digitalmente. Mas um fato é importante, como demonstrado em outros estudos, essa planta tem propriedades anti-inflamatórias e a doença periodontal tem um componente inflamatório importante, assim podemos sugerir que o extrato de *P. paniculata* pode sim ter boa aplicação como adjuvante na perda óssea causada pela doença periodontal no período de reparo.

Observando os resultados obtidos em várias pesquisas envolvendo a doença periodontal, concluiu-se que a influência sobre a perda óssea se dá nas citocinas pró-inflamatórias, onde a atuação se encontra direta ou indiretamente, levando a possíveis resultados satisfatórios. Entretanto, na pesquisa com *P. paniculata* não foi abordada a quantificação dos fatores estimuladores da inflamação, apenas a utilização do método radiográfico. Ressalta-se ainda, este trabalho ainda está em andamento para detecção da atuação do EHPP, podendo apresentar resultados que outros autores encontraram através de métodos histológicos. Com esses métodos, Branco e Almeida *et al* (2012), observaram diminuição dos níveis de interleucina 1 e prostaglandina E2, com diminuição da inflamação e maior proteção da estrutura óssea e preservação de fibras colágenas. Já Botelho *et al* (2013), relatou uma diminuição de TNF Alfa e interleucina 1beta com concomitante diminuição de macrófagos e neutrófilos, assim diminuindo a liberação de oxigênio reativo e diminuição da perda óssea. Fernandes *et al* (2010) também relatou diminuição de algumas citocinas citadas anteriormente, assim como, na atividade das enzimas colagenases e uma modificação do efeito osteoclástico. Com isso, estas pesquisas citadas mostraram o poder dos fármacos sobre as citocinas, evidenciando possíveis citocinas onde *P. Paniculata* também pode atuar, e assim caracterizar seu potencial antiinflamatório. O extrato Hidroalcoólico de *P. Paniculata* diferencia-se em relação a outros tratamentos por apresentar além da atuação antiinflamatória, possível atuação gástrica e potente analgesia como analisado em pesquisas passadas.

Em relação ao poder de indução da doença, os resultados obtidos nessa pesquisa demonstram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e naive, estes resultados estão em concordância com dados anteriores que demonstraram a efetividade da ligadura em induzir doença periodontal em ratos.

7. CONCLUSÃO

Considerando as limitações encontradas para a realização do presente estudo, é possível concluir que o extrato da *P. paniculata* melhorou o reparo ósseo nos dentes com doença periodontal induzida.

Assim, este trabalho caracteriza-se como de nível experimental inicial, porém de grande valia para futuras pesquisas mais abrangentes, vindo a esclarecer melhor a sua utilidade em situações clínicas.

8. REFERÊNCIAS

- 1- GARCIA, Valdir Gouveia; FERNANDES, Leandro Araújo; MACARINI, Valmir Campos *et al.* Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. 12, p. 1106-14, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092666>.
- 2- CARRANZA, Fermin A. et al. Carranza Periodontia Clínica. Tradução de Rodrigo Melo Nascimento et al. 10 Ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2007.
- 3- LINDHE, Jhan; KARRING; Jhan, LANG Niklaus P. Tratado de periodontia e implantodontia oral. Tradução de Edison Jorge Lima. 4 E Ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Choogan 2005.
- 4- KELES, Gonca Cayir; ACIKGOZ, Gokhan; AYAS, Bulent *et al.* Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. **The Indian journal of medical research**, v. 121, n. 3, p. 176-84, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802760>.
- 5- FERNANDES, Leandro Araújo; MARTINS, Thiago Marchi; ALMEIDA, Juliano Milanezi De *et al.* Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 18, n. 6, p. 635-40, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308297>.
- 6- ALENCAR, Veruska B M; BEZERRA, Mirna M; LIMA, Vilma *et al.* Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 73, n. 3, p. 251-6, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924589>.
- 7- MEOTTI, Flavia Carla; ARDENGHI, Juliana V; PRETTO, Juliana B. *et al.* Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from

Polygala sabulosa (Polygalaceae) in mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 107-12, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393470>. Acesso em: 5 Jun. 2013.

8- BRANCO-DE-ALMEIDA, Luciana S; FRANCO, Gilson C; CASTRO, Myrella L. *et al.* Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 5, p. 664-71, 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3364595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 18 Jun. 2013.

9- DUANG, Xing-yu; WANG, Qian; ZHOU, Xue-dong *et al.* Mangiferin: a possible strategy for periodontal disease to therapy. **Medical hypotheses**, v. 76, n. 4, p. 486-8, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194846>. Acesso em: 17 Jun. 2013.

10- CARMONA, Glaucia Babeto, KLEBER, Renan; TEIXEIRA, Costa *et al.* Effect of andiroba oil on periodontitis in Wistar rats. **Acta Cir. Bras.** 1. v. 28, n. 6, p. 430-434, 2013.

11- BOTELHO, M a; RAO, V S; CARVALHO, C.B.M. *et al.* Lippiasidoides and Myracrodruonurundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 471-8, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714897>. Acesso em: 17 Jun. 2013.

12- NAPIMOGA, Marcelo H; BENATTI, Bruno B; LIMA, Flavia O. *et al.* Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 216-22, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070683>. Acesso em: 18 Jun. 2013.

13- LAPA, Fernanda Da R; GADOTTI, Vinicius M; MISSAU, Fabiana C. *et al.* Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from Polygala paniculata L. in mice. **Basic & clinical pharmacology &**

toxicology, v. 104, n. 4, p. 306-15, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281602>. Acesso em: 23 Mar. 2014.

14- LAPA, Fernanda Da Rocha; FREITAS, Cristina Setim; BAGGIO, Cristiane Hatsuko *et al.* Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 10, p. 1413-9, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17910817>. Acesso em: 23 Mar. 2014.

15- RIBAS, Camila M; MEOTTI, Flavia C; NASCIMENTO, Francisney P. *et al.* Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 103, n. 1, p. 43-7, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598298>. Acesso em: 26 May 2013.