

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

HENRIQUE GUILHERME DE CASTRO TEIXEIRA

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DOS
NEUROPEPTÍDEOS CGRP, VIP E SP EM TECIDO ÓSSEO
SAUDÁVEL E TECIDO ÓSSEO DA PERIODONTITE
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em
Odontologia, área de Periodontia.

PIRACICABA

1999

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

HENRIQUE GUILHERME DE CASTRO TEIXEIRA

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DOS
NEUROPEPTÍDEOS CGRP, VIP E SP EM TECIDO ÓSSEO
SAUDÁVEL E EM TECIDO ÓSSEO DA PERIODONTITE
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 21/02/2000

Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em
Odontologia, área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Prof. Dr. Sérgio de Toledo

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo

Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon

PIRACICABA

1999

UNIDADE	Be
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	Ex
TOMBO BC	40711
PROC.	248100
C	☐
D	☒
PREÇO	311,00
DATA	25/03/00
N.º CPD	

CM-00135089-5

Ficha Catalográfica

T235e Teixeira, Henrique Guilherme de Castro.
Estudo imunohistoquímico dos neuropeptídeos CGRP, VIP e SP em tecido ósseo saudável e em tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura em ratos. / Henrique Guilherme de Castro Teixeira. --del s. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
99f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Neuropeptídeos. 2. Periodontite. I. Sallum, Antônio Wilson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 23 de Novembro de 1999, considerou o candidato HENRIQUE GUILHERME DE CASTRO TEIXEIRA aprovado.

1. Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

2. Prof. Dr. RICARDO GUIMARÃES FISCHER

3. Profa. Dra. MARIA CHRISTINA MARQUES NOGUEIRA CASTANHO

4. Prof. Dr. ROBERTO FRAGA MOREIRA LOTUFO

5. Prof. Dr. SERGIO DE TOLEDO

A meus pais e a meu irmão, sempre
presentes com seu amor, apoio e
incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, meu dedicado e competente orientador, o agradecimento pelo muito que contribuiu para que este trabalho chegasse ao seu término.

Ao Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer, cujas qualidades humanas, conhecimentos e capacidade, o fizeram uma fonte de inspiração para este trabalho.

Aos colegas do Departamento de Anatomia da UFJF, pelo apoio constante, compreensão e incentivo na carreira universitária.

Aos Profs. da Disciplina de Periodontia da Unicamp, cujo estímulo e apoio à minha formação profissional, foram de grande ajuda.

Aos colegas de doutorado, pela amizade e companheirismo durante o curso.

Ao Prof. Rogério Estevan Farias, do Departamento de Morfologia da UFJF, pela orientação na leitura das lâminas.

À técnica Sra. Elizabeth Jovette D'Ávila, cuja colaboração permitiu a execução dos procedimentos técnicos deste trabalho.

Às Dras. Andréa M. de Souza Fernandes Erhardt e Edla A. Barros Sanglard meu muito obrigado pelo inestimável apoio e segura orientação.

À Profa. Maria Inês Boechat Gomes, pela fundamental colaboração na digitação e editoração do texto.

Aos responsáveis pela contribuição na revisão lingüística deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Ao primo Marco Aurélio Dias de Castro, minha gratidão e saudade.

À minha esposa Flávia e minha filha Isabella, que compreenderam as constantes ausências e souberam me encorajar durante todo o curso.

Aos meus pais e irmão, que confiaram em mim e incentivaram a minha caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	2
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1- INTRODUÇÃO.....	9
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3- PROPOSIÇÃO.....	26
4- MATERIAL E MÉTODOS	28
5- RESULTADOS.....	38
5.1- HISTOPATOLOGIA.....	39
5.2- DADOS RADIOGRÁFICOS.....	44
5.3- IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTI-CALCITONINA, ANTI-POLÍPEPTÍDEO VASOATIVO E ANTI-SUBSTÂNCIA P.....	48
6- DISCUSSÃO.....	64
6.1- HISTOPATOLOGIA.....	66
6.2- DADOS RADIOGRÁFICOS	67
6.3- IMUNOHISTOQUÍMICA.....	68
6.3.1- IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O NEUROPEPTÍDEO CGRP.....	70
6.3.2- IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O NEUROPEPTÍDEO VIP.....	72
6.3.3- IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O NEUROPEPTÍDEO SP.....	74
7- CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICES.....	90

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1-	Resultados das análises radiográficas nos dias zero,14 e 28.....	47
TABELA 2-	Resultados da imunohistoquímica para o CGRP, SP e VIP no dia zero sem ligadura.....	61
TABELA 3-	Resultados da imunohistoquímica para o CGRP, SP e VIP com 14 dias de ligadura.....	62
TABELA 4-	Resultados da imunohistoquímica para o CGRP, SP e VIP com 28 dias de ligadura.....	63
QUADRO 1-	Resultados histopatológicos das biópsias controles no dia zero.....	91
QUADRO 2-	Resultados histopatológicos das biópsias experimentais e controles com 14 dias.....	93
QUADRO 3-	Resultados histopatológicos das biópsias experimentais e controles com 28 dias.....	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FOTO 1	Fotomicrografia de gengiva normal.....	40
FOTO 2	Fotomicrografia de gengiva com leve infiltrado inflamatório inespecífico.....	41
FOTO 3	Fotomicrografia de gengiva com moderado infiltrado inflamatório inespecífico.....	42
FOTO 4	Fotomicrografia de gengiva com acentuado infiltrado inflamatório inespecífico.....	43
FOTO 5	Foto de imagem radiográfica tecido ósseo normal.....	44
FOTO 6	Foto de imagem radiográfica tecido ósseo com perda óssea com 14 dias.....	45
FOTO 7	Foto de imagem radiográfica tecido ósseo com perda óssea com 28 dias.....	46
FOTO 8	Fotomicrografia de tecido ósseo sem marcação (<i>score</i> zero).....	48
FOTO 9	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação levemente positiva (<i>score 1</i>).....	49
FOTO 10	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação moderadamente positiva (<i>score 2</i>).....	50
FOTO 11	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação intensamente positiva (<i>score 3</i>).....	51
FOTO 12	Fotomicrografia de tecido ósseo sem marcação para CGRP.....	52
FOTO 13	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação levemente positiva para CGRP.....	53
FOTO 14	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação moderadamente positiva para CGRP.....	54

FOTO 15	Fotomicrografia de tecido ósseo sem marcação para VIP.....	55
FOTO 16	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação levemente positiva para VIP.....	56
FOTO 17	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação moderadamente positiva para VIP.....	57
FOTO 18	Fotomicrografia de tecido ósseo com marcação intensamente positiva para VIP.....	58
FOTO 19	Fotomicrografia de tecido ósseo sem marcação para SP (controle).....	59
FOTO 20	Fotomicrografia de tecido ósseo sem marcação para SP (experimental).....	60

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

µm - Micrômetro

A - Ausente

ACH - Acetilcolina

ATP - Adenosina-Trifosfato

BSA – Albumina bovina

cc – centímetro cúbico

CGRP - Polipeptídeo Relacionado com Gene da Calcitonina

cm - centímetro

CONT - Controle

D - Direita

DAB – Diamino Benzdimo Dako Líquido

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DP – Desvio padrão

E - Esquerda

EX - Exsudato

EXP - Experimental

GUNA – Gengivite úlcero-necrosante aguda

HE - Hematoxilina e Eosina

IgA – Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

kVp - Quilowolts

mA – miliampére

min - Minuto

ml - Mililitro

mm - Milímetro

NA – Noradrenalina

nº - número

P - Presente

PA - Pura

PMNs - Polimorfonucleares

RDO – Rápido descalcificador ósseo

Rx- C14 – Rato x- biópsia controle com 14 dias

Rx- C28 – Rato x- biópsia controle com 28 dias

Rx- CO – Rato x- biópsia controle dia zero

Rx- E14 – Rato x- biópsia experimental com 14 dias

Rx- E28 – Rato x- biópsia experimental com 28 dias

seg - segundos

SP - Substância P

TRIS – Solução salina hidroxymethylaminomethon

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UNICAMP – Universidade de Campinas

VIP - Polipeptídeo Intestinal Vasoativo

x – vezes

RESUMO

O objetivo do presente estudo imunohistoquímico foi avaliar a presença e mudanças nas concentrações dos neuropeptídeos (neuropeptídeo relacionado com gene da calcitonina, polipeptídeo intestinal vasoativo e substância P) em tecido ósseo saudável e em tecido ósseo da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Vinte e um ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*) machos, adultos, com peso variando de 200 a 300 gramas e com aproximadamente 100 dias de idade, originários do Biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram selecionados. Os ratos não apresentaram alterações sistêmicas. A doença periodontal foi induzida através de ligaduras de seda, colocadas ao redor do 1º molar inferior esquerdo. As ligaduras foram mantidas durante 14 e 28 dias. O lado direito, sem ligadura, serviu como lado controle. O exame radiográfico foi realizado para constatar a perda óssea do lado experimental. Sete animais foram sacrificados nos dias zero, 14 e 28. Os animais foram alimentados com ração para ratos (Purina®) e água "ad libitum". Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Hidrato de Cloral a 10% na dosagem de 0,3 g/Kg de peso corporal. Área experimental, era necessário a apresentação de imagem radiográfica compatível com perda óssea na crista óssea alveolar. A região contra-lateral, sem ligadura, foi considerada área controle. As biópsias foram preparadas pela técnica da imunohistoquímica e analisadas em microscópio óptico com aumento de 200X e 400X. Os resultados indicaram a presença do neuropeptídeo CGRP e VIP em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo saudável e em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura, ao redor de vasos sanguíneos e nervos. Aos 14 dias não foi possível observar diferenças significativamente estatísticas entre as áreas controles e experimentais. Aos 28 dias foi possível detectar, nas áreas experimentais, sua presença nas mesmas regiões que nas áreas controles em quantidade menores ($p < 0.05$) dos neuropeptídeos CGRP e VIP em osteócitos e osteoblastos. O neuropeptídeo SP não foi demonstrado, tanto nas áreas experimentais como nas áreas controles. Estudos adicionais são necessários para mapear esses neuropeptídeos nos demais tecidos do

periodonto para verificar as alterações quantitativas nesses e outros neuropeptídeos, e esclarecer o possível papel no processo patogênico da doença periodontal.

ABSTRACT

The aim of the present immunohistochemical study was to demonstrate the present and change in concentration of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P) in healthy bone and in bone associated to ligature induced periodontitis in rats. Twenty one adult male rats (*Rathus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), weighted between 200 and 300 grams, 100 days old, were selected. The rats should not have any systemic disease. Periodontal disease was induced with silk ligatures, placed around the left lower molar. The ligatures were left in place for 14 and 28 days. The right lower molar was the control side, without ligatures. Rx was done at experimental and control areas. The experimental areas presented radiographical bone loss, while the control areas didn't present radiographical bone loss. 7 animals were sacrificed on days 0, 14 and 28. The animals were feeded with rat food (Purina®) and water "*ad libitum*". The animals were anesthetized with 10 % "hidrato Cloral", 0,3g/kg of body weight. Bone loss should be observed radiographically at the experimental area. The biopsies were prepared with immunohistochemical techniques and analyzed under light microscopy, with magnifications of X 200 and X 400. The results showed the presence of neuropeptides CGRP and VIP in osteocytes and osteoblasts of healthy bone tissue and bone tissue from ligated areas, and around blood vessels and nerves. At 14 days, there was no statistically significant difference in CGRP and VIP between experimental and control areas. At 28 days CGRP and VIP were significantly decreased in experimental areas when compared to control areas ($p < 0,05$). Neuropeptide SP was not detected, either in experimental or control areas. Further studies are necessary to map the distribution of these neuropeptides in the other periodontal tissues to observe their quantitative levels, and clarify their possible role in the pathogenic process of periodontal disease.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A doença periodontal é placa dependente (LOE et al.,1965). No entanto, sua patogênese pode envolver inúmeros mecanismos, incluindo vários componentes da resposta do hospedeiro (requisição de componentes do soro, liberação de substâncias vasoativas, recrutamento de células inflamatórias, ativação de fagócitos e secreção local de mediadores inflamatórios, imunoglobulinas e alteração de neuropeptídeos locais), sendo que cada um apresenta potencial de informação diagnóstica em relação ao estado de saúde ou doença periodontal (OFFENBACHER,1993).

A inervação gengival vem sendo estudada por inúmeros pesquisadores através de diferentes técnicas. Métodos de impregnação de metal e microscopia eletrônica (BERNICK,1957; DIXON,1962) revelam a ultra estrutura nervosa da gengiva, epitélio humano (BERNICK,1957; DIXON,1962; LUTHMAN et al.,1988) e gengiva de rato (MARTINEZ & PEKARTHY,1974; MAEDA et al.,1987).

Estudos imunohistoquímicos têm sido utilizados para detectar a distribuição de marcadores neuronais nas gengivas de ratos (WAKISAKA et al.,1985; LUTHMAN et al.,1988) nos vasos sangüíneos gengivais de gatos (EDWALL et al.,1985) e na gengiva humana (BERNICK,1957; TEIXEIRA, 1997). Estudos indicam a evidência de peptídeos ativos biologicamente e outros

marcadores neuronais descritos tanto em fibras nervosas quanto em elementos celulares (GUYTON,1992). As sinapses no sistema nervoso central, em sua maioria, são químicas, utilizando-se de substâncias neurotransmissoras capazes de excitar o neurônio, inibi-lo ou modificar sua sensibilidade. Destas substâncias, algumas são mais conhecidas como a acetilcolina, noradrenalina, histamina e a serotonina. No entanto, outras são menos conhecidas, mas com funções ainda em estudo e, ao que tudo indica, relevantes dentro do processo inflamatório como os neuropeptídeos CGRP, VIP, SP (BARTOLD et al.,1994).

O Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) tem sido encontrado nas fibras parassimpáticas junto com a acetilcolina, a Substância P (SP) e o Polipeptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina (CGRP) coexistindo na subpopulação de neurônios no sistema nervoso sensorial (EKBLAD et al.,1984; UDDMAN et al.,1985). Além disso, alteração na distribuição de marcadores neuronais foi observada em gengiva humana com hiperplasia por fenitoína (LUTHMAN et al.,1988).

Os neuropeptídeos são substâncias que interagem com os neurotransmissores Acetilcolina (ACH) e Noradrenalina (NA) na pré ou pós junção sináptica. Eles estão relacionados com os nervos sensoriais (SP e CGRP, interagindo com ATP e NA) e com os nervos motores autônomos (VIP, interagindo com ACH) (FURNESS et al.,1982; BARJA et al.,1983; GIBBINS et al.,1985; TERENCEHI et al.,1986). São encontrados em vesículas isoladas, próximos aos demais neurotransmissores. Sua função é atuar como um modulador, aumentando ou diminuindo a quantidade de transmissores

liberados, ou como um modulador pós junção, por alterar o tempo de curso ou extensão das ações do neurotransmissor (BURNSTOCK,1987).

Neuromodulador é uma substância que modifica o processo de neurotransmissão. Ele pode atuar como um modulador na pré-junção, por diminuir ou aumentar a quantidade de transmissores liberados pelos varicosítios nervosos, ou pode atuar como um modulador pós-junção, por alterar o tempo de curso ou extensão da ação do neurotransmissor (BURNSTOCK,1987).

Os neuropeptídeos podem estar envolvidos no mecanismo (*trophic*) de longo termo de crescimento, diferenciação e regeneração dos tecidos efetivos ou no modelo de crescimento e orientação de nervos durante o desenvolvimento e regeneração tecidual (BURNSTOCK,1981; DHALL et al.,1986).

Os neuropeptídeos são produzidos como parte de grandes moléculas protéicas pelos ribossomos no corpo celular. Após a síntese, são transportados para o retículo endoplasmático e posteriormente são levados para o aparelho de Golgi, onde ocorrem modificações (estas moléculas proteicas são clivadas em fragmentos menores, liberando o próprio neuropeptídeo ou um precursor. No aparelho de Golgi o neuropeptídeo é empacotado em pequenas vesículas, que são soltas no citoplasma). Essas vesículas entram no fluxo axônico e caminham até a extremidade da fibra nervosa (telodendro, região da sinapse nervosa), onde liberam seu neurotransmissor. Quantidades muito pequenas destes neurotransmissores são liberadas. Entretanto, isso é compensado por sua potência que chega a ser mil ou mais vezes superior à dos transmissores

de molécula pequena, como a serotonina e a acetilcolina (responsáveis pela vasoregulação). Os neuropeptídeos possuem também como importante característica sua ação muito mais prolongada, quando comparados com outras substâncias neurotransmissoras (BARTOLD et al., 1994).

As substâncias CGRP, VIP e SP atuam influenciando o sistema nervoso e podem estar associadas tanto à patogênese da reação inflamatória (*neurogenic inflammation*) como também ao metabolismo ósseo (KIERMAN, 1975; PANERAI & SACERDOTE, 1993). O sistema nervoso central pode influenciar diretamente no sistema imunológico. A substância VIP atua na homeostase e faz a mais importante ligação entre o sistema nervoso e o imunológico (PANERAI & SACERDOTE, 1993). Estes indicativos mostram uma presença de substâncias pró-inflamatórias, tais como o neuropeptídeo P (SP) e sensoriais aferentes primários mediando a reação inflamatória (GAZELIUS et al., 1987). Outrossim, o sistema nervoso simpático pode também contribuir para mudanças fisiológicas da inflamação e a regulação do metabolismo ósseo (LEVINE et al., 1985). O processo de desnervamento pode influenciar a cicatrização óssea (KJARTANHSON & DALSGAARD, 1987; OFFENBACHER & COLLINS, 1993).

Existem vários modelos de estudo de patogenia em animais. Um dos mais conhecidos é o da periodontite induzida por ligaduras. Esse modelo foi avaliado por JOHNSON (1975) e SALLUM (1982) em ratos, LINDHE & SUAMBERG (1974) e KARRING et al. (1993) em cães, PAGE (1991) em macacos, FISCHER (1993) em furões e PAGE & SCHOROEDER (1982) em

outros animais. Mesmo assim, os modelos animais não podem ser considerados como ideais, pois os mesmos não reproduzem a patogenia, evolução e severidade das doenças periodontais de forma idêntica à dos humanos. Entretanto, são de grande valia, pois podemos obter um modelo experimental do processo da doença periodontal mais controlado, além de ser possível produzir defeitos de iguais dimensões, executar biópsias do periodonto de sustentação. Em ratos as condições anatômicas, fisiológicas e imunológicas são bem próximas dos humanos. Através da colocação de ligadura ao redor do dente, o acúmulo de placa bacteriana pode desenvolver uma inflamação inicial e, posteriormente, com a progressão da inflamação, ocasionar uma periodontite (PAGE & SCHOROEDER, 1982).

O objetivo do presente estudo imunohistoquímico é avaliar a presença e as mudanças nas concentrações dos neuropeptídeos (CGRP, VIP, SP) em tecido ósseo saudável e em tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura em ratos.

REVISÃO DA LITERATURA

2-REVISÃO DA LITERATURA

KIERMAN (1975), BURNSTOCK (1977) e PERNOW (1983) indicam que as substâncias P e ATP podem ser liberadas dos nervos sensoriais durante o impulso antidrômico para promover interações locais; e o ATP pode induzir produção local de prostaglandinas.

LUNDEBERG (1981), LEE et al. (1985), UDDMAN et al. (1985), relatam que os peptídeos CGRP e SP têm sido mostrados em terminais nervosos sensoriais em nervos perivasculares.

BURNSTOCK (1981) e DHALL et al. (1986) demonstram que as substâncias P e CGRP podem estar diretamente relacionadas com o crescimento, diferenciação e regeneração dos tecidos ou com o modelo de crescimento e orientação de nervos durante o desenvolvimento e regeneração tecidual.

FURNESS et al. (1982), BARJA et al. (1983), GIBBINS et al. (1985), TERENCEHI et al. (1986) relatam que os neuropeptídeos SP e CGRP são substâncias que interagem com os neurotransmissores ACH, NA na pré ou pós junção sináptica, e estes, estão relacionados com os nervos sensoriais, onde a substância P e CGRP estão interagindo com ATP e NA.

LEVINE et al. (1985) demonstraram que a substância P (SP) contida em fibras eferentes nociceptoras numa articulação desenvolve artrite mais

severa, sugerindo a participação da SP na injúria articular. A evidência direta de que o fator favorecedor da inflamação liberado pelos nociceptores é a SP, é demonstrada pela evidência encontrada de que injeções de SP numa articulação aumentam a severidade da artrite naquela articulação. Mostraram ainda claramente que elementos aferentes periféricos e do sistema nervoso simpático contribuem para as manifestações clínicas da artrite experimental. Estes estudos sugerem que a interrupção cirúrgica ou funcional da inervação para a articulação pode tornar-se clinicamente útil em doenças com a artrite reumatóide. Ainda que a patogenia da doença não possa ser alterada, interferindo na base patológica da inflamação, pode ser possível aliviar significativamente a severidade dos sintomas ou da injúria articular.

LEVINE et al. (1985) evidenciaram que fibras periféricas eferentes e do sistema nervoso simpático contribuem para manifestações clínicas da artrite.

STANISZ et al. (1987) concluíram que as substâncias VIP e SP atuam influenciando o sistema nervoso. Concluíram também, que os nervos e os fatores que regulam o crescimento tecidual e substâncias dos tecidos nervosos podem ter profundo efeito sobre as células do sistema imunológico e que o sistema nervoso central pode diretamente influenciar a imunidade.

BURNSTOCK (1987) relata que a neuromodulação, assim como a neurotransmissão, ocorrem numa junção neuromuscular vascular. Um neuromodulador é definido com uma substância que modifica o processo de neurotransmissão. Ele pode atuar como um modulador pré-junção sináptica (aumentando ou diminuindo a quantidade de transmissores liberados pelos

varicosítios nervosos) ou como um modulador pós-junção sináptica por alterar o tempo de curso ou extensão da ação do neurotransmissor. Afirmar também, ocorrer fala cruzada (*cross talk*) entre os peptídeos SP e CGRP (em nervos sensoriais) e VIP (em nervos motores autônomos) com NA, ACH e ATP. Por exemplo, a interação da substância VIP com a ACH em nervos parassimpáticos. O VIP é liberado dos mesmos nervos, especialmente sob frequências de alta estimulação, para produzir vasodilatação marcada. Ele atua como um neuromodulador para ganhar, substancialmente, o efeito pós-junção sináptica da ACH na secreção da célula acinar e a liberar a ACH das vesículas nervosas via receptores pré-junção sináptica.

LUTHMAN et al. (1988) evidenciaram a presença da substância P e CGRP nos nervos sensoriais. Os nervos da inervação autônoma têm mostrado imunorreatividade para o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), CGRP e SP. Os outros autores indicam que fibras varicosas nervosas imunorreativas para CGRP ou SP foram encontradas na lâmina própria, usualmente na vizinhança do epitélio. Contudo, algumas vezes foram encontradas nas partes basais do epitélio. As fibras positivas para CGRP têm uma distribuição similar, isto é, em torno dos vasos sangüíneos. No entanto, foram observadas fibras SP isoladas na lâmina própria e, em muitas veias, próximas ou no epitélio, sem conexão óbvia com vasos sangüíneos. Tanto SP como CGRP têm sido observados na pele humana, onde têm uma função sensorial. Não foi possível determinar onde SP e CGRP coexistem na fibra nervosa, mas a distribuição das fibras imunorreativas indicam que SP e CGRP estão localizadas juntas na fibra

nervosa sensorial gengival.

LUTHMAN et al. (1988) mostraram que a gengiva humana com hiperplasia induzida por fenitoína, apresenta à vista uma inervação menos densa de fibras neurofilamentos imunorreativas, embora nenhuma modificação óbvia possa ser observada pela ocorrência dos neuropeptídeos SP e CGRP.

LUNDEBERG et al. (1989) demonstraram a presença dos neuropeptídeos na inervação simpática e parassimpática perivascular.

NÄRHI (1989) mostrou a presença dos neuropeptídeos na reação inflamatória da polpa, através da ativação de nervos simpáticos por receptores sensoriais intradentais.

LUTHMAN et al. (1989) encontraram fibras nervosas imuno-reativas para neuropeptídeos densamente distribuídas e mais profundamente no tecido conjuntivo de sítios periodontais afetados.

RAMIERI et al. (1990) observaram a rica inervação gengival em áreas especializadas do ligamento periodontal, sua distribuição durante a erupção dental e durante a doença periodontal.

ITOTAGAWA (1990) encontrou numerosas fibras contendo neuropeptídeos no tecido conjuntivo da mucosa do palato duro, algumas penetrando no epitélio. Na gengiva, encontrou especialmente no sulco, abaixo do epitélio juncional e ao redor de vasos sangüíneos na mucosa do palato duro.

OFFENBACHER et al. (1993) mostraram que a patogênese da destruição dos tecidos periodontais envolve uma sequência de ativação originada de vários componentes da resposta do hospedeiro, cada uma delas

podendo potencialmente fornecer informações que dizem respeito ao estudo da saúde ou doença dos tecidos periodontais. Os produtos produzidos localmente na patogênese periodontal incluem 4 categorias, dentre elas: 1- produtos de degradação tecidual, 2- marcadores de lise celular 3- destruição de tecido conjuntivo 4- secreção de mediadores inflamatórios.

PANERAI & SACERDOTE (1993) afirmam que a substância VIP pode induzir a quimiotaxia de monócitos humanos. O efeito dos polipeptídeos é mediado por receptores específicos que foram demonstrados serem idênticos aos receptores cerebrais. Demonstram, também, que as concentrações de VIP nas células monucleares do sangue periférico não aumentavam com a idade nas pessoas examinadas entre 20 a 99 anos. Os autores relatam que a importância da substância VIP na homeostase é a mais importante ligação entre o sistema nervoso e o imunológico.

HEYERAAS et al. (1993) evidenciaram que o dente e os tecidos de suporte são abastecidos por nervos vindos do gânglio trigeminal e por nervos simpáticos. Identificaram também que o ligamento periodontal está ricamente suprido com fibras nervosas apicais, laterais e no osso alveolar, estendendo nervos adjacentes para o cemento celular radicular.

FRISTAD et al. (1994) concluíram que os nervos imunoreativos para os neuropeptídeos SP e CGRP seguem a mesma distribuição e desenvolvimento cronométrico das estruturas dentais.

SUGAYA et al. (1995) relataram que fibras nervosas na gengiva não têm somente funções somatossensoriais e nociceptivas, mas também de

colaborar na regulação do processo inflamatório. Citam também que as fibras nervosas sensoriais são especialmente mais numerosas no epitélio juncional do que no ligamento periodontal.

NOREVALL et al. (1995) mostraram que o ligamento periodontal tem duas funções importantes: a transmissão de impulsos nociceptivos centrais e liberação de neuropeptídeos periféricos.

TEIXEIRA et al. (1997) demonstraram a presença dos neuropeptídeos CGRP, VIP e SP em sítios saudáveis e em sítios com doença periodontal. Demonstraram, também, que os neuropeptídeos estavam diminuídos quantitativamente nos sítios experimentais quando comparados com os sítios controles.

2.1.- Inflamação

LINDHE (1989) demonstrou que os mediadores endógenos da inflamação e suas funções estão relacionados com as seguintes substâncias dentre outras: histaminas (aumento da permeabilidade e vasodilatação), cininas (relaxamento e contração da musculatura lisa dos vasos, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos e dor), sistema complemento (mobilização, aderência, quimiotaxia de leucócitos, produção de linfocina, reabsorção óssea), prostaglandinas (vasodilatação, permeabilidade celular, dor, reabsorção óssea, modulação de leucócitos), etc.

CARRANZA (1992) descreveu que reações imunes são respostas de

proteção do hospedeiro à presença de substâncias, como bactérias e vírus. Estas são denominadas: tipo I (anafilaxia: quando anticorpos, IgE e IgG, podem sensibilizar os mastócitos para reações de hipersensibilidade, gerando a liberação de compostos vasoativos das células sensibilizadas, causando respostas inflamatórias e induzindo a destruição tecidual da doença periodontal), tipo II (citotóxicas: anticorpos, IgG e IgM, ativam o sistema complemento, ocasionando lise celular, lesão tecidual pelo aumento da síntese e liberação de enzimas lisossômicas dos PMNs revestidas com antígeno), tipo III (reação de Arthus: quando existem elevados níveis de antígeno, fazendo com que haja precipitação dos complexos, levando a lesão tecidual. Pela atração de neutrófilos que fagocitam estes complexos e liberam substâncias danosas ao tecido), tipo IV (reações mediadas por células que têm como características: infiltrado de PMNs, destruição de tecido conjuntivo normal) e reações por citotoxicidade celular dependente do anticorpo.

CARRANZA (1992) relatou a importância do fluido sulcular (ação protetora), da permeabilidade do epitélio, dos leucócitos (predominantemente neutrófilos, com capacidade fagocítica e destrutiva) e da saliva (eliminação de ácidos produzidos pela placa, controle da atividade bacteriana, contém anticorpos reativos para placa e lisosima) na resistência à placa e à injúrias mecânicas.

WILSON & KORNMAN (1996) relataram que a resposta inflamatória é uma sequência de reações vasculares e celulares que caracterizam a reação do organismo a uma injúria. Sendo assim: rubor e calor (devido a um aumento

do fluido sangüíneo na área), tumor (devido ao movimento do fluido vascular para tecidos extravasculares), dor (devido à liberação de mediadores neurogênicos na área inflamada) e, por último, a perda de função, são os sinais que caracterizam a reação inflamatória. Os eventos vasculares são caracterizados, principalmente, por aumento ou diminuição da permeabilidade vascular, liberação de histamina, bradicinina e plasmina por células de defesa, como os mastócitos e o aumento do número de neutrófilos circulante caracteriza a resposta celular.

2.2- Inflamação Neurogênica

COHEN-COLE et al. (1981) observaram que havia relação entre uma vida estressante e as doenças gengivais agudas, demonstrando que depressões transitórias da quimiotaxia para neutrófilos no sangue periférico em pacientes com GUNA (Gengivite Úlcero-Necrosante Aguda), havendo aumento da susceptibilidade à doença periodontal.

SHEPHERD et al. (1988) concluíram que procedimentos de sedação diminuem os parâmetros laboratoriais do estresse emocional, pela mensuração dos sinais vitais, trocas no soro e do hormônio de crescimento humano.

GENCO (1992) concluiu que os neuropeptídeos têm papel importante no estresse, mediando mecanismos de defesa do hospedeiro no eixo psico-neuro-imunológico. A avaliação do papel do estresse e estados de angústia, pareados com medidas de anormalidades nervosas, endócrinas ou

imunológicas em pacientes com severas formas de doença periodontal talvez forneçam como objetivos básicos para a identificação dos indivíduos com risco de desenvolver uma doença periodontal.

MURAYAMA et al. (1994) citaram o papel do estresse psicológico na GUNA, sugerindo efeitos psicossomáticos no periodonto, através do sistema neuro-endócrino-imune.

HART et al. (1994) concluíram que a defesa do hospedeiro e a resposta inflamatória são controladas e ampliadas por receptores. Os PMNs têm receptores de catecolaminas para neuropeptídeos e glucocorticóides. Nos períodos de estresse, seus níveis aumentam. Assim, interações entre o sistema imune e o sistema nervoso talvez sejam significantes nas doenças periodontais. O estresse atua na alteração da resposta dos PMNs às bactérias periodontopáticas, então, fatores ambientais e o estresse estão correlacionados com as doenças periodontais.

BARTOLD et al. (1994) tinham a hipótese de que a inflamação neurogênica talvez haja complicando ou modificando a doença periodontal.

SUGAYA et al. (1995) relataram que fibras nervosas sensoriais na gengiva têm não só funções somatosensoriais e nociceptivas, mas também colaboram na regulação inflamatória e na resposta imune, através da liberação de neuropeptídeos. Sendo assim as regiões que são afetadas pela inflamação neurogênica (liberação de neuropeptídeos e substâncias com várias funções inflamatórias) dependem das ramificações nervosas.

Sugeriram também que a inflamação gengival possa ter algumas

causas que incluem resposta vascular e inflamação neurogênica. O epitélio juncional é um sítio de atividade de defesa contra a infecção bacteriana, processo que talvez seja regulado pela densa inervação peptidérgica neste tecido. Concluíram, também, que fibras nervosas trigeminais fornecem um substrato que facilita a difusão da inflamação de um lado para outro da gengiva por mecanismos neurogênicos.

PROPOSIÇÃO

3- PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo imunohistoquímico é avaliar a presença e as mudanças nas concentrações dos neuropeptídeos (CGRP, VIP, SP) em tecido ósseo saudável e em tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

4-MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e um ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*) machos, adultos, com peso variando de 200 a 300 gramas e com, aproximadamente, 100 dias de idade, originários do Biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram selecionados. Os ratos não apresentaram alterações sistêmicas. Os animais foram alimentados com ração de ratos (Purina®) e água "*ad libitum*".

4.1- INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Hidrato de Cloral a 10% na dosagem de 0,3 g/Kg de peso corporal, usando uma seringa tipo Luer de 3cc. A doença periodontal foi induzida através de ligaduras de seda preto da marca Gutternam nº 10. Ligaduras foram colocadas ao redor do 1º molar inferior esquerdo, e deixadas por 14 e 28 dias. A região contra-lateral, sem ligadura, foi considerada área controle.

4.2- EXAME RADIOGRÁFICO E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Exame radiográfico periapical da área experimental e controle foram feitos de cada animal, após os animais serem sacrificados por inalação de éter

etílico sendo suas mandíbulas removidas, divididas na sínfise mentoniana e fixadas em formol a 10% durante 24 horas.

As hemi-mandíbulas foram posicionadas com a superfície lingual sobre o filme radiográfico periapical da marca Kodak Ep 21, com as cúspides vestibulares e linguais no mesmo plano horizontal.

O aparelho de Raio X utilizado foi o da marca Siemens Heliodont ajustado para 07mA e 70 kVp e tempo de exposição de 0,25 seg. a uma distância foco filme de 24 cm.

O processamento radiográfico foi efetuado empregando-se uma processadora automática modelo Level 360 da marca J. Morita, sendo usadas soluções de processamento da marca Kodak.

Para análise do nível de perda óssea foi utilizado um aparelho Ampligraph Castells®. As radiografias eram ampliadas 10 vezes, e a distância da cúspide méso vestibular até a crista óssea foi medida com auxílio de um compasso de ponta cega e régua milimetrada. As medidas foram em milímetro (MAIA, 1988).

4.3- COLETA DA AMOSTRA

Sete animais foram sacrificados nos dias zero (0), 14 e 28. Em seguida, 2 biópsias do periodonto de proteção e sustentação de cada área experimental e controle foram removidas cirurgicamente de cada rato. As biópsias foram removidas a 5 mm da mesial do 1º molar até a distal do 2º molar

de cada área, usando-se para corte uma tesoura de tamanho médio. Nesse momento, foi observado se as ligaduras permaneciam nas áreas experimentais. Após a retirada das biópsias, os tecidos foram imediatamente, fixados em paraformoldeído a 10% por um período de 24 horas. A seguir, os materiais experimental e de controle entraram na fase de processamento para histopatologia e imunohistoquímica, conforme descrição a seguir.

4.4- PROCESSAMENTO PARA HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

4.4.1- Fase da descalcificação

As biópsias foram colocadas no descalcificador RDO (rápido descalcificador ósseo- Dako. Novacastra®), 3 partes de RDO para 1 de água destilada, por 24 horas.

4.4.2- Fase da desidratação

As biópsias foram colocadas em banho de álcool absoluto durante 30 minutos, em uma estufa a 56 graus, repetindo-se esse procedimento (banho) três vezes.

4.4.3- Fase de diafanização

As biópsias foram colocadas em banho de xilol durante 30 minutos em uma estufa a 56 graus. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez.

4.4.4- Fase impregnação de parafina

Iniciada com um banho de parafina durante 1 hora em uma estufa a 60 graus, repetindo-se o mesmo procedimento mais uma vez.

4.4.5- Fase inclusão do material

Todas as biópsias foram incluídas em blocos de parafina. Foram executados cortes histológicos seriados vestibulo-linguais até que os mesmos apresentassem toda a extensão da raiz mesial, ligamento e processo alveolar. Após o posicionamento ideal, 4 cortes com 5 μ m em cada bloco foram realizados. Após os cortes histológicos, uma lâmina experimental e uma lâmina controle de cada animal foi corada com procedimento pela hematoxilina e eosina (HE) (BECAK & PAULETE, 1976). Em seguida, outros três cortes das biópsias experimental e controle foram preparados para a reação da imunohistoquímica.

IMUNOHISTOQUÍMICA

O preparo em imunohistoquímica segue o roteiro subsequente. As fases de 1 a 5 foram as mesmas realizadas para HE.

4.4.6- Filmagem das lâminas

As lâminas foram colocadas em uma solução de Aminopropil-triethoxi

Silano (SIGMA®) com o objetivo de aderir o corte à lâmina.

4.4.7- Solução de filmagem

Na solução de filmagem foram seguidas as seguintes etapas:

1ª Etapa- Preparo das lâminas

- A- Lavar com solução sulfocrônica por 24 horas;
- B- Lavar em água corrente por 5 min;
- C- Deixar em álcool absoluto por 24 horas;
- D- Deixar secar em estufa a 37 graus por 10 min.

2ª Etapa - Filmagem

- A- Preparar 2 ml de Silano em 100 ml de acetona P.A.;
- B- Deixar as lâminas nesta solução por 2 minutos;
- C- Lavar em água destilada (para limpeza);
- D- Secar em estufa a 37 graus por 30 min;
- E -Lâmina pronta para receber o corte histológico de 5 µm;
- F-Lâmina em estufa a 56 graus, para iniciar a Técnica de Imunohistoquímica do Método Avidina-Biotina (para desparafinar).

4.4.8-Técnica de imunohistoquímica: Método Avidina-Biotina

- A- Desparafinar em 3 banhos de xilol por 10 minutos cada;
- B- Passar por 3 banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada;
- C- Retirar as lâminas do álcool e colocar em solução alcoólica amoniaca a

- 10% por 10 minutos para a retirada de pigmento de formol;
- D- Lavar em água corrente por 5 minutos;
- E- Colocar em solução de água oxigenada a 10% em metanol (meio a meio), por 30 minutos, para a inibição da peroxidase endógena;
- F- Lavar em água corrente por 5 minutos;
- G- Lavar em tampão solução salina hidroxymethyl aminomethan (Tris) pH 7.8 em 3 banhos de 3 minutos cada;
- H- Enxugar ao redor do corte com papel de filtro;
- I- Pingar soro normal, Goat Kit ABC Vector Pk 4001-Rabbit, e colocar durante 20 minutos a 37 graus na câmara úmida (bloqueio de fundo);
- J- Escorrer o soro normal e gotejar o anticorpo primário *overnight* em câmara úmida e deixar na geladeira (24 horas);
- K- Lavar 3 vezes em Tris, sendo cada banho por 3 minutos. Secar ao redor do corte e gotejar o anticorpo secundário anti-Rabbit IFG biotinilado por 30 minutos e deixar em uma câmara úmida a 37 graus;
- L- Lavar 3 vezes com Tris durante 3 minutos cada banho;
- M- Secar ao redor do corte e pingar o reagente ABC Vector Avidina-Biotina e deixar durante 30 minutos em câmara úmida a 37 graus (marcador);
- N- Lavar com Tris em 3 banhos de 3 minutos cada;
- O- Revelação com Diamino Benzidimo Dako Líquido (DAB) Substrato Cromogeno coloração controle positivo no microscópio, tempo varia de 2 a 5 min.

- P- Contracorar com Hematoxilina de Mayer durante 1 minuto (específica de núcleo para contraste, facilita a visualização);
- Q- Lavar em água corrente por 5 min;
- R- Lavar em água amoniaca a 1%, mergulhando e tirando;
- S- Lavar em água corrente por 5 min;
- T- Passar as lâminas em 4 banhos de álcool absoluto e em 3 banhos de xilol (para desidratar as lâminas);
- U- Montar com bálsamo.

As diluições usadas para os anticorpos primários foram 1:5 para a Calcitonina (Sigma®), 1:5000 para SP (Chemicon®) e 1:500 para VIP (Chemicon®); diluídos em BSA (Albumina bovina, SIGMA®). Controle negativo e positivo foram executados para todos os neuropeptídeos, confirmando que os mesmos estavam em condições ideais de uso.

Após o término da técnica, as lâminas foram analisadas por microscópio óptico, marca Nikon modelo Micropholt com um aumento de 200X e 400X.

4.5- Análise histopatológica

As amostras foram incluídas em parafina, seccionadas com espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (HE) (BECAK & PAULETE, 1976).

Foi considerada área normal a biópsia de gengiva que exibisse

epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas (sem aumento exuberante da vascularização, sem exocitose neutrofílica, sem hemácias extravasadas e sem hiperplasia epitelial), discreto aumento da vascularização. Leve infiltrado inflamatório inespecífico era aquele que as biópsias da gengiva exibissem epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização e exocitose neutrofílica leve. Moderado infiltrado inflamatório inespecífico era aquele que as biópsias da gengiva exibissem epitélio escamoso estratificado, presença de pequeno número de mononucleares e neutrófilos. Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. Acentuado infiltrado inflamatório inespecífico era aquele que as biópsias da gengiva exibissem epitélio escamoso estratificado, presença de grande número de mononucleares e neutrófilos (com exocitose acentuada). Hemácias extravasadas, vascularização moderada e hiperplasia epitelial moderada.

4.6- Análise Imunohistoquímica com anti-calcitonina, anti-poli-peptídeo intestinal vasoativo e anti-substância P

Sabendo-se que os neuropeptídeos neuronais CGRP, VIP e SP são encontrados na lâmina própria da gengiva humana (COONS,1958; DHALL et al.,1986), ao redor de vasos sangüíneos, nervos (COONS,1958; DHALL et al.,1986) e em células ósseas (*in vitro* são estimuladas pelo CGRP, para formação óssea), (FRISTAD et al.,1994) e também foi encontrado além dos

locais já descritos, marcação no epitélio para o neuropeptídeo CGRP (TEIXEIRA,1997). A análise do presente estudo foi assim padronizada. Após percorrer toda a lâmina, foi feita a contagem de células e a quantificação da marcação seguiu os seguintes critérios segundo SANNINO & SHOUSA (1994).

- *Score zero (0)* - negativo (Foto 8)
- *Score um (1)* - levemente positivo (1+/3+) até 1/3 de células coradas (Foto 9)
- *Score dois (2)* - moderadamente positivo (2+/3+) até 2/3 de células coradas (Foto 10) e
- *Score três (3)* - intensamente positivo (3+/3+) mais que 2/3 de células coradas (Foto 11).

A análise da imunohistoquímica foi executada por outro profissional que não conhecia a área experimental e controle para não interferir nos resultados.

4.7- Análise Estatística

O t-teste para amostras pareadas foi utilizado para verificar diferenças nos grupos experimentais e controles no dia zero, 14 e 28. O valor de p foi estabelecido em 0.05.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- HISTOPATOLOGIA

A histopatologia foi incluída neste trabalho para corroborar com os achados radiográficos, uma vez que não é possível fazer exame clínico em ratos para demonstrar doença periodontal.

Os quadros 1, 2 e 3, em apêndice, mostram os resultados da histopatologia de todos os animais. Cada animal está dividido em dois grupos (experimental e controle) para sacrifício com 14 e 28 dias. O grupo com sacrifício no dia zero representa o grupo controle. Este grupo apresentou um achado de tecido normal (n=4) e um leve infiltrado inflamatório inespecífico (n=3) (quadro 1). Os animais de 8 a 14 e de 15 a 21 foram considerados os grupos experimentais com sacrifício no dia 14 e 28 respectivamente. O grupo com sacrifício com 14 dias apresentou um achado de moderado infiltrado inflamatório inespecífico (n=5) e acentuado (n=2). (quadro 2). O grupo com sacrifício com 28 dias, apresentou um achado de leve infiltrado inflamatório inespecífico (n=1) e moderado (n=6). (quadro 3).

A seguir, nas fotomicrografias 1, 2, 3 e 4 são ilustrados alguns achados histopatológicos.

Na fotomicrografia 1 é mostrada uma biópsia de gengiva normal exibindo epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas

significativas e discreto aumento da vascularização.

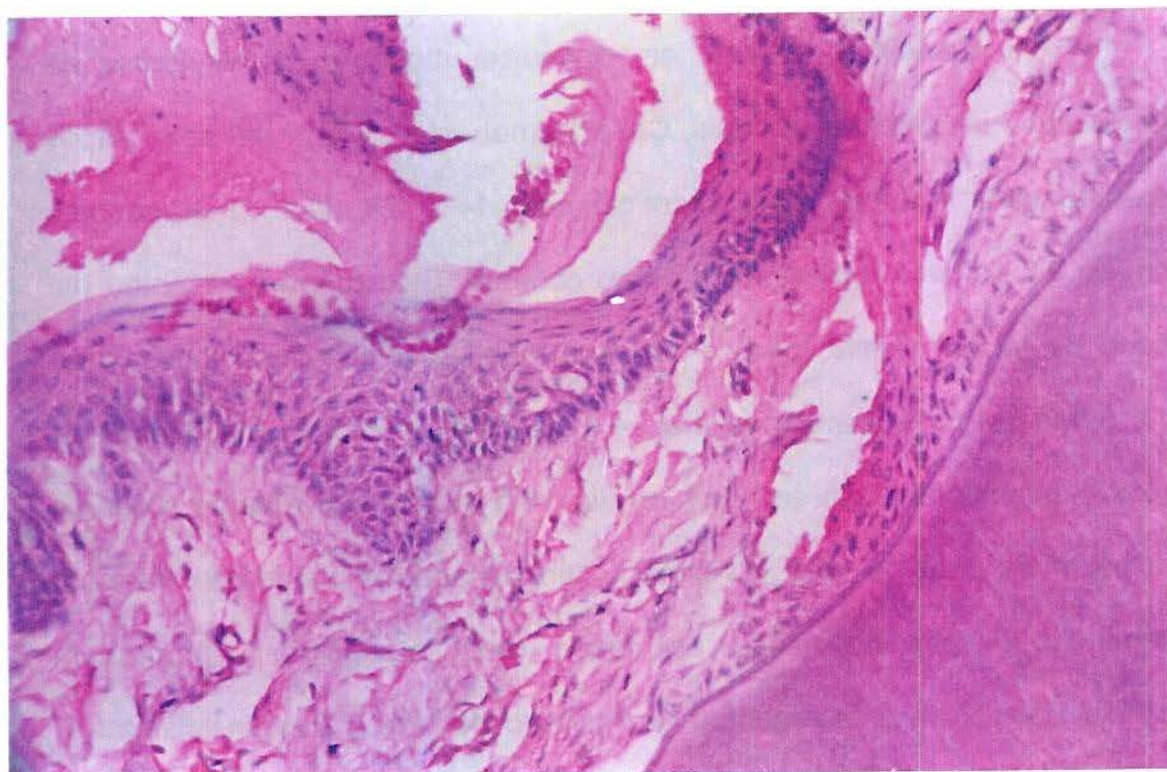


Foto 1: Gengiva normal com HE. (aumento 200x).

Na fotomicrografia 2 é mostrada uma biópsia de gengiva com um leve infiltrado inflamatório inespecífico presente no epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas e exocitose neutrofílica leve.

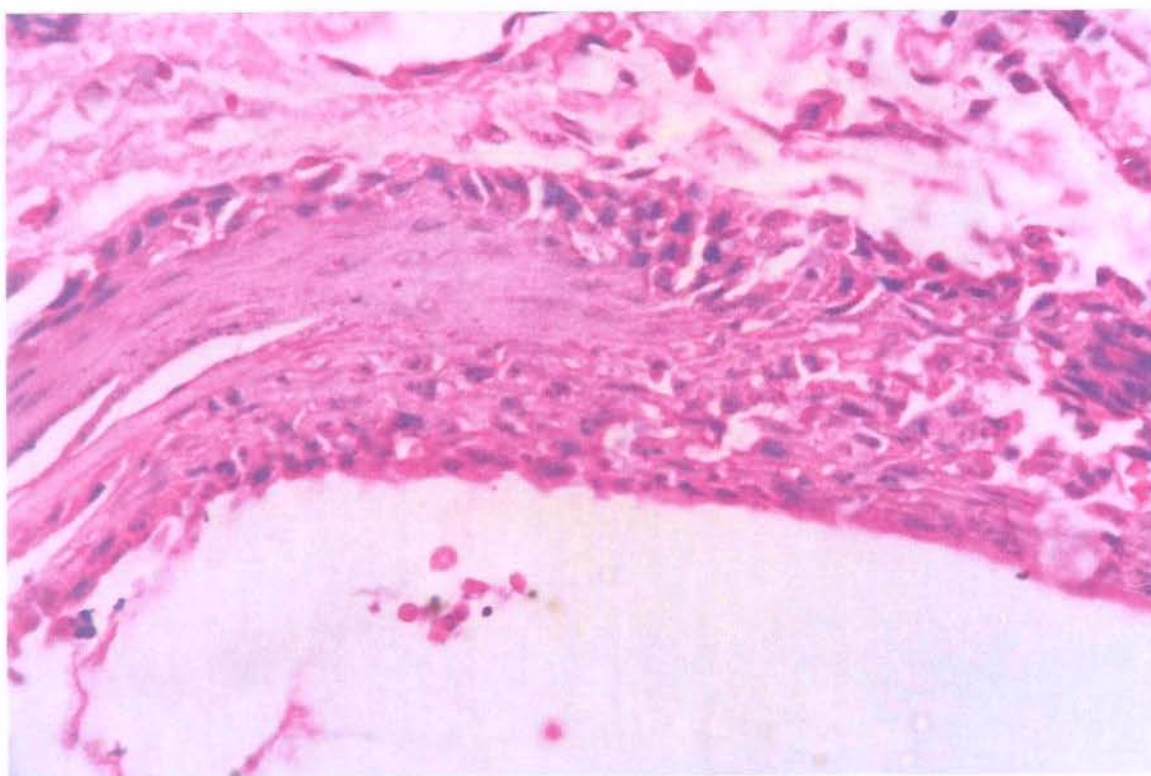


Foto 2: Leve infiltrado inflamatório corado com HE (aumento 400x).

Na fotomicrografia 3 é mostrada uma biópsia de gengiva com presença de moderado infiltrado inflamatório inespecífico presente no epitélio escamoso estratificado e tecido conjuntivo, constituído por pequeno número de mononucleares e neutrófilos. Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada.

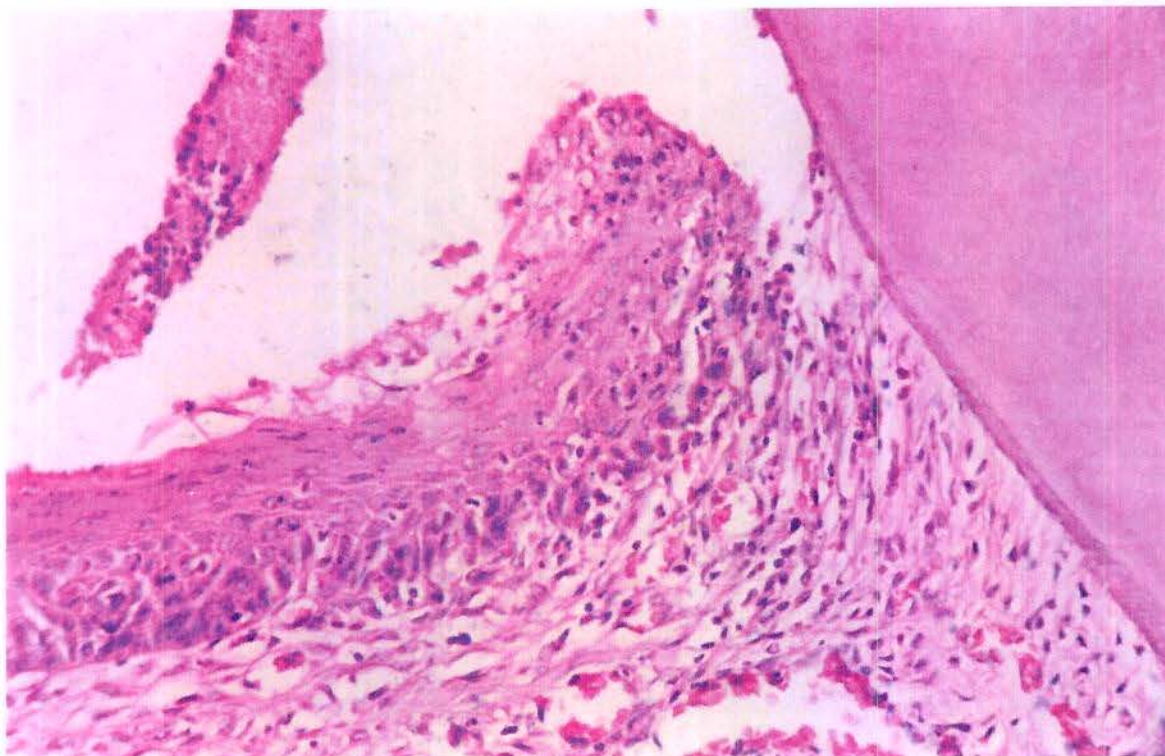


Foto 3: Moderado infiltrado inflamatório inespecífico corado com HE. (aumento 200x).

Na fotomicrografia 4 é mostrada uma biópsia de gengiva com um acentuado infiltrado inflamatório inespecífico presente no conjuntivo e epitélio constituído por grande número de mononucleares e neutrófilos (com exocitose acentuada). Hemácias extravasadas e vascularização moderada.

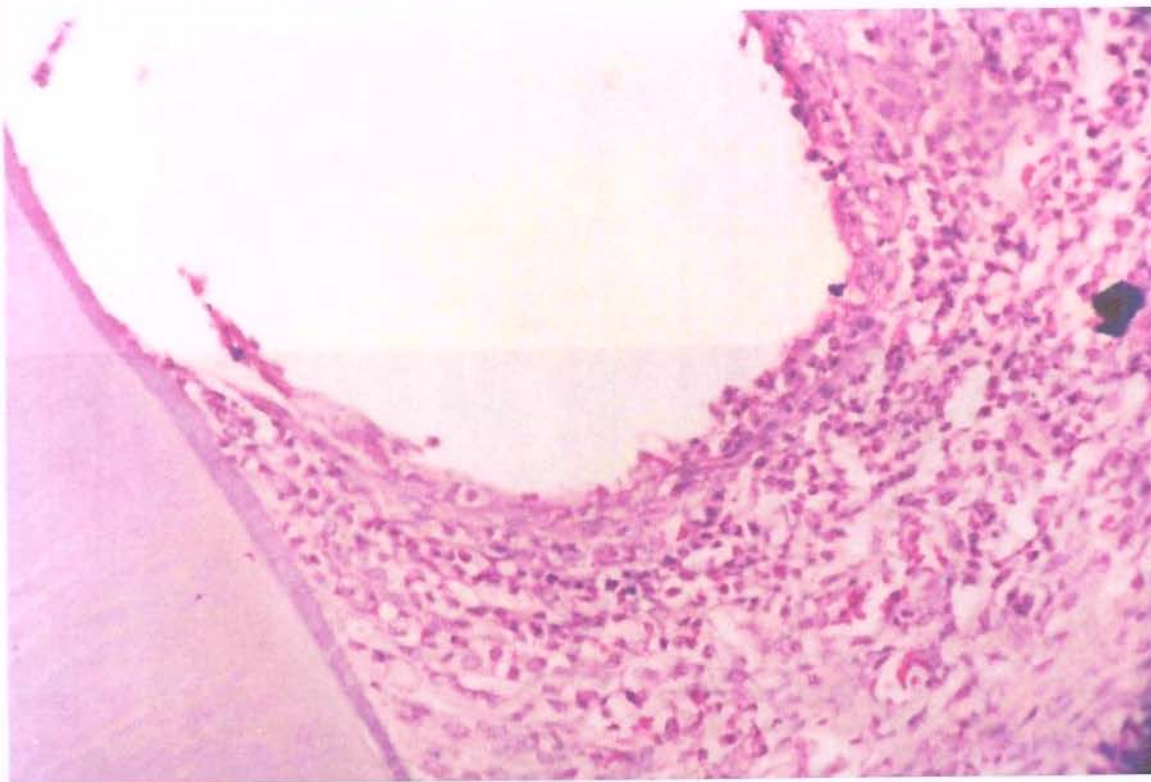


Foto 4: Acentuado infiltrado inflamatório inespecífico corado com HE. (aumento 200x).

Nos quadros 1, 2 e 3, em apêndice, são apresentadas as descrições dos resultados histopatológicos dos dias zero, 14 e 28 dos vinte e um ratos.

5.2-DADOS RADIOGRÁFICOS

Na foto 5 é mostrada uma imagem radiográfica normal, sem alterações radiológicas.

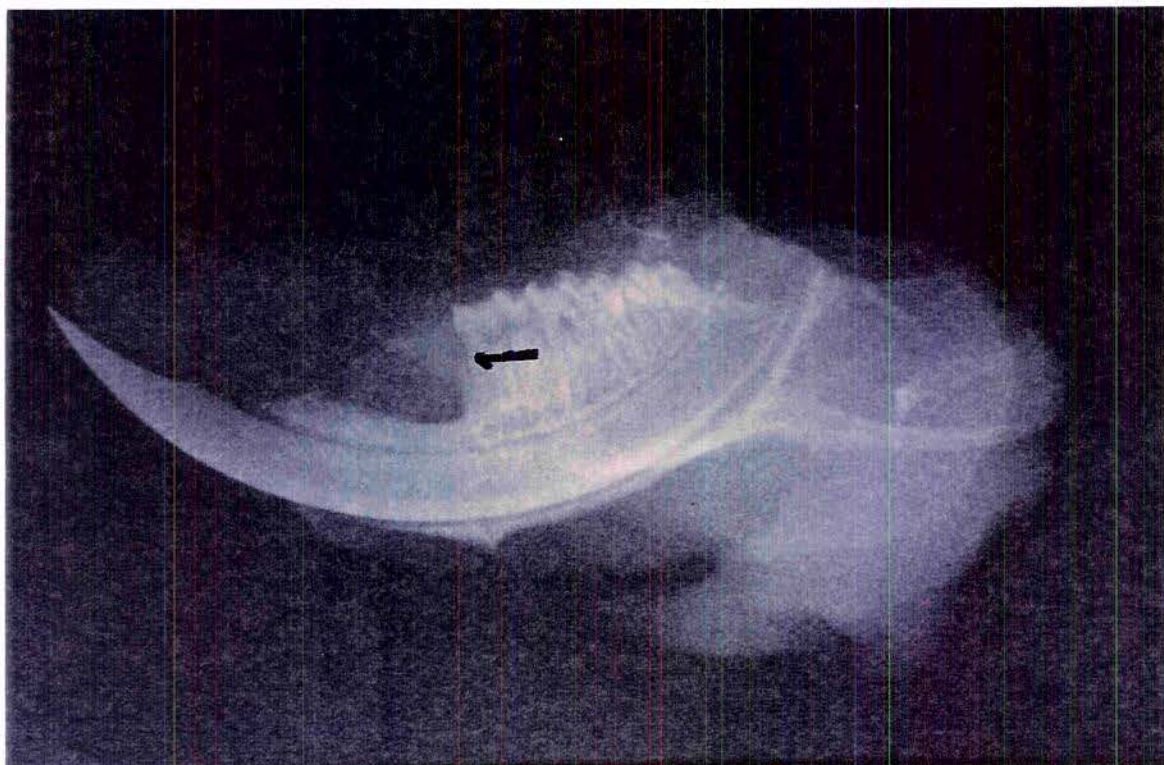


Foto 5: Imagem radiográfica normal, controle dia zero (aumento 4x)

Na foto 6 é mostrada uma imagem radiográfica com perda óssea com 14 dias.

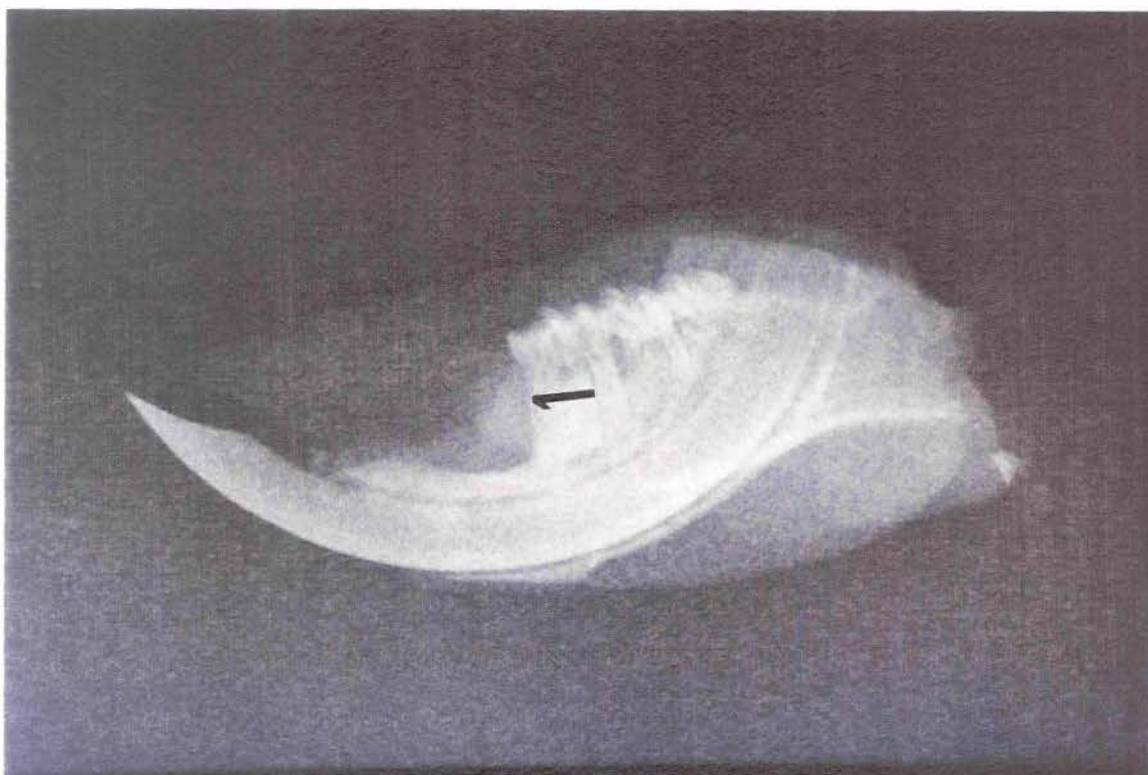


Foto 6: Imagem radiográfica com perda óssea, experimental 14 dias (aumento 4x).

Na foto 7 é mostrada uma imagem radiográfica com perda óssea com 28 dias.



Foto 7 : Imagem radiográfica com perda óssea, experimental 28 dias. (aumento 4x)

Na tabela 1 são mostrados os resultados dos achados radiográficos de todos os animais tanto da área controle como da área experimental.

TABELA 1: RESULTADOS DAS ANÁLISES RADIOGRÁFICAS NOS DIAS ZERO, 14 e 28.

Dia 0		Dia 14			Dia 28		
Controle			Exp.	Controle		Exp.	Controle
R1	14	R8	22	14	R15	23	14.5
R2	13.5	R9	22	14	R16	25	15
R3	14	R10	20.5	14	R17	20.5	14.5
R4	13.5	R11	20	14	R18	24	14.5
R5	13.5	R12	19	14	R19	25.5	14
R6	13.5	R13	16.5	13.5	R20	21	13.5
R7	14	R14	20.5	13.5	R21	23	14
Média -	13.71	Média	20.07 ⁺	13.85	Média	23.14 ^{Y*}	14.28
DP -	0.26	DP	1.90	0.24	DP	1.88	0.48

Medidas em mm. Exp. = experimental.

✦ $p < 0.05$ comparando exp. com controle dia 14

^Y $p < 0.05$ comparando exp. com controle dia 28

⌘ $p < 0.05$ comparando exp. 14 com exp. 28

Rx = Rato x

5.3- IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTI-CALCITONINA, ANTI-POLÍPEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO E ANTI-SUBSTÂNCIA P

Sabemos que os neuropeptídeos CGRP, VIP e SP são encontrados na lâmina própria da gengiva humana (COONS, 1958; DHALL et al.,1986; TEIXEIRA,1997), ao redor de vasos sanguíneos e nervos (COONS,1958; DHALL et al.,1986; TEIXEIRA,1997) e no epitélio para o CGRP (TEIXEIRA, 1997). A quantificação da marcação dos neuropeptídeos no tecido ósseo no presente estudo foi feita seguindo os critérios de SANNINO & SHOUSA (1994) conforme ilustrado a seguir:

Na fotomicrografia 8 não há nenhuma marcação em tecido ósseo de neuropeptídeo CGRP, sendo considerada com *score* zero.



Foto 8: VIP *score* zero, controle dia zero (aumento 400x)

Na fotomicrografia 9 pode ser observada uma marcação em tecido ósseo levemente positiva, sendo considerada com *score* 1.

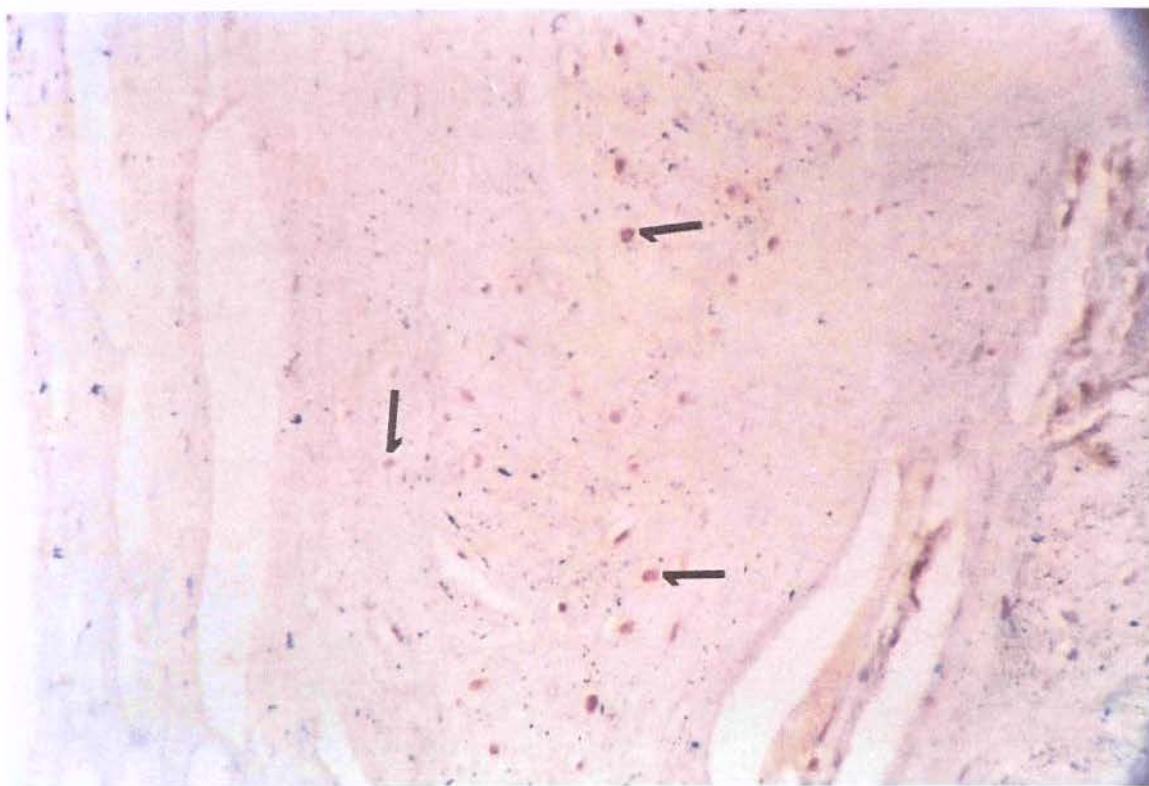


Foto 9: VIP levemente positivo, *score* 1, controle 14 dias (aumento 200x)

Na fotomicrografia 10 pode ser observada uma marcação em tecido ósseo moderadamente positiva, sendo considerada com *score* 2.

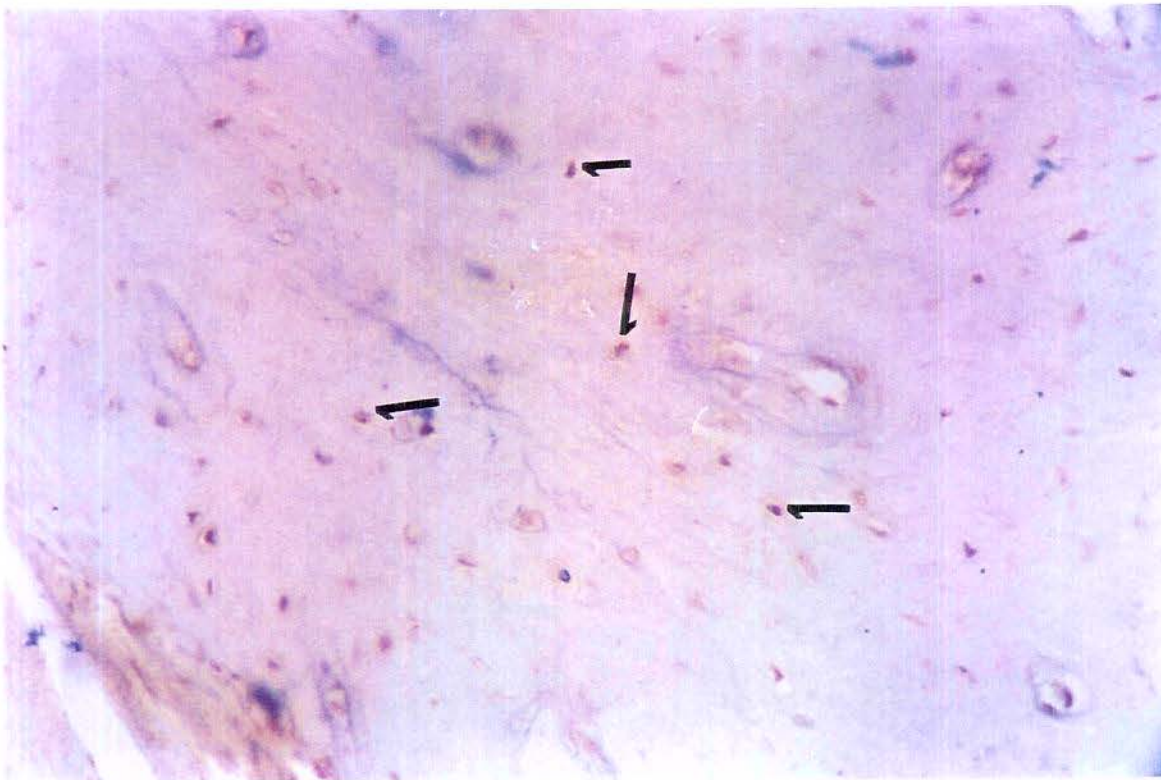


Foto 10: VIP moderadamente positivo, *score* 2, controle 28 dias (aumento 200x)

Na fotomicrografia 11 pode ser observada uma marcação em tecido ósseo intensamente positiva, sendo considerada com *score* 3.

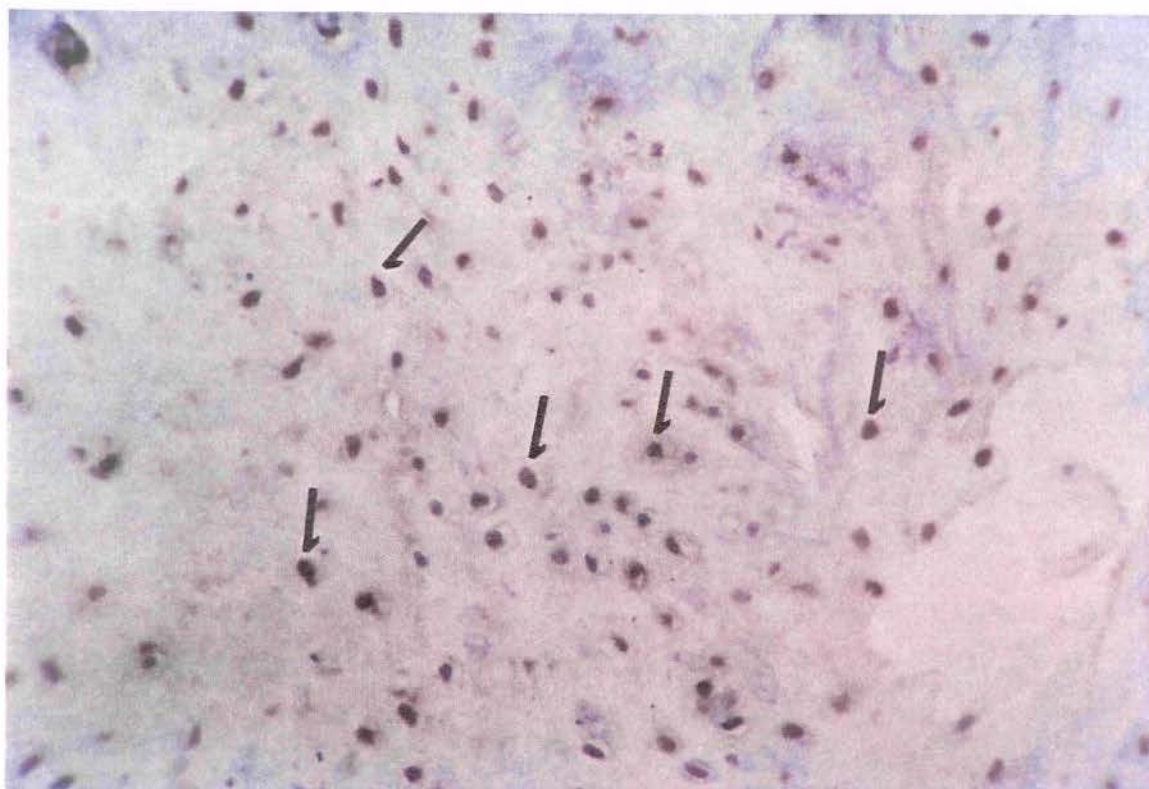


Foto 11: VIP intensamente positivo, *score* 3, controle 28 dias (aumento 200x)

Nos resultados obtidos para a CGRP é possível observar a presença no tecido ósseo dos seguintes *scores*: zero (foto12), 1 (foto13) e 2 (foto 14). Os achados para a VIP foram: zero (foto15), 1 (foto 16), 2 (foto 17) e 3 (foto18). Para SP não foi encontrada nenhuma marcação tanto na área experimental como na área controle, fotos 20 e 21.

POLIPEPTÍDEO RELACIONADO COM O GENE DA CALCITONINA (CGRP)

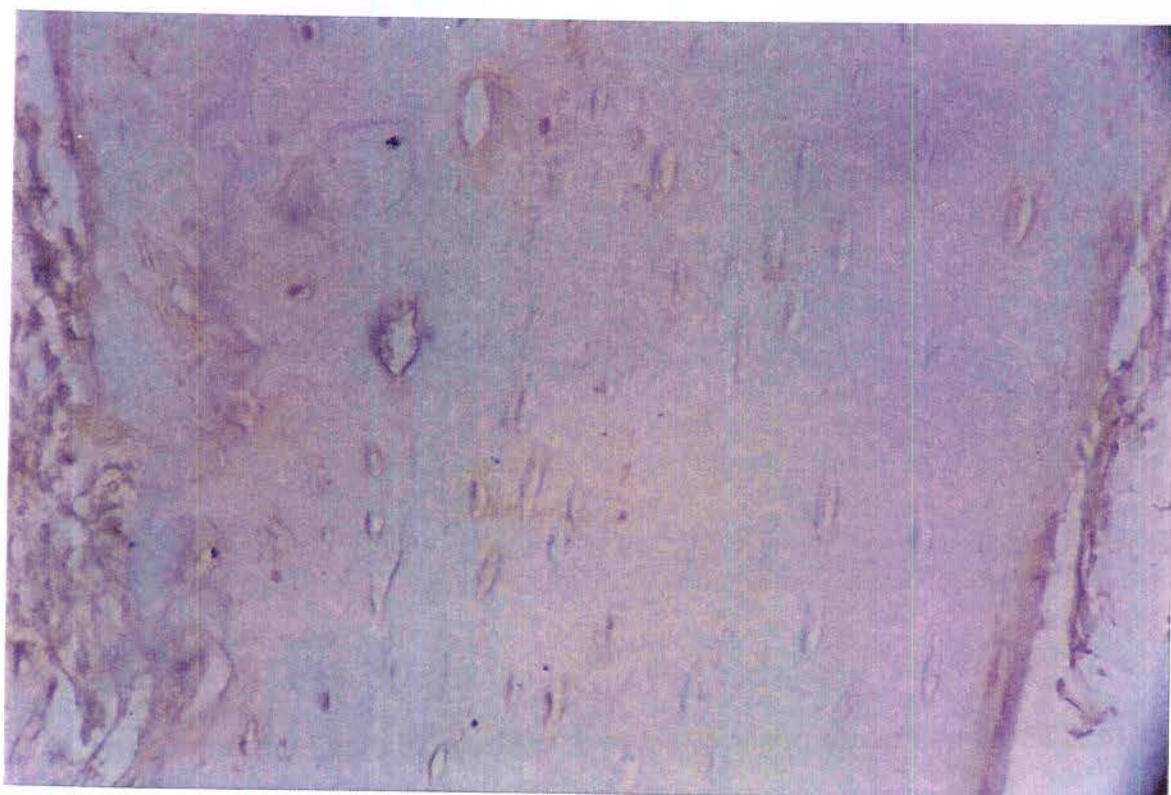


Foto 12: CGRP score zero, controle dia zero. (aumento 200x)

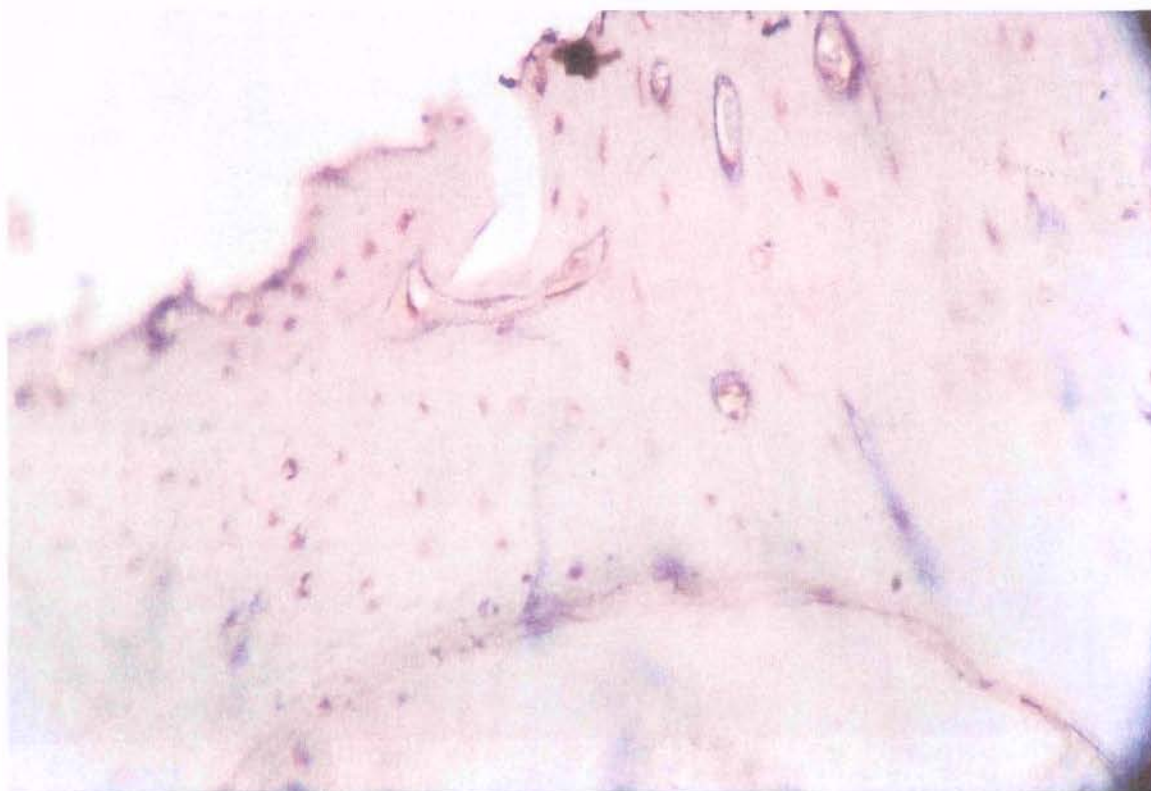


Foto 13: CGRP levemente positivo, score 1, controle 28 dias (aumento 200x)

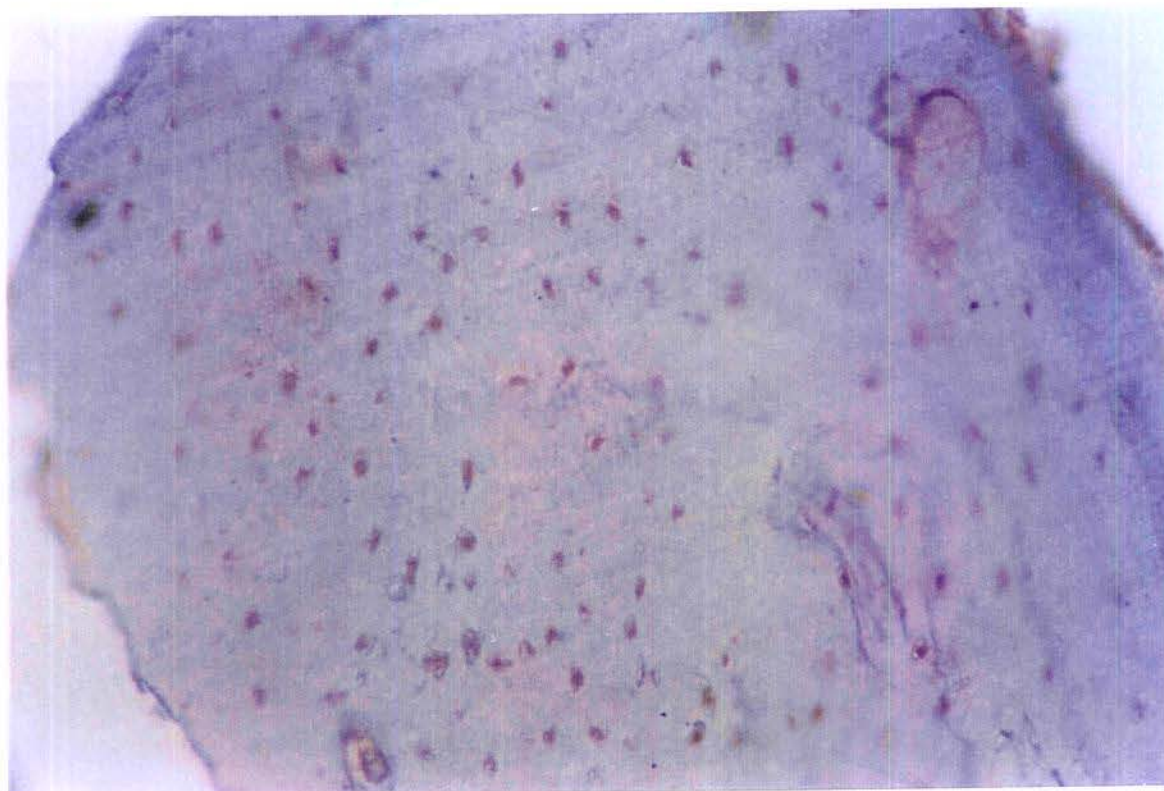


Foto 14: CGRP moderadamente positivo, *score* 2, controle 28 dias (aumento 200x).

POLÍPEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP)

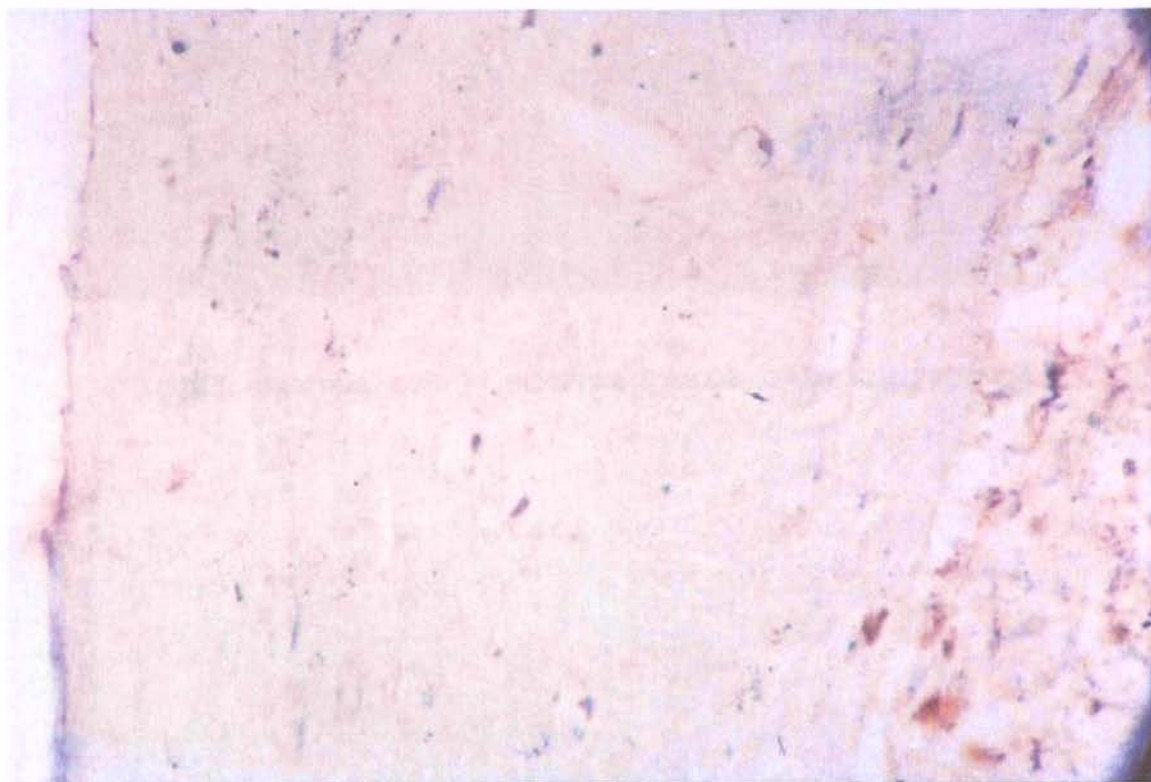


Foto 15: VIP score zero, controle dia zero. (aumento 400x)

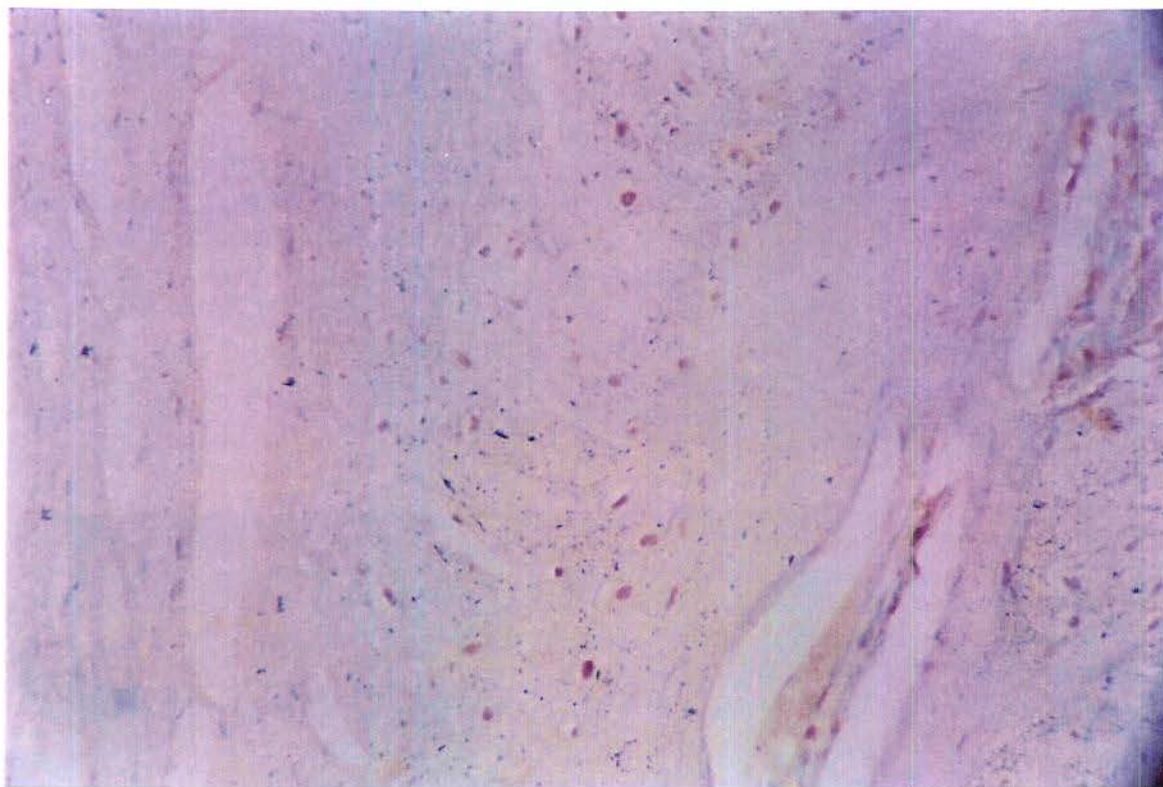


Foto16: VIP levemente positivo, score 1, controle 14 dias (aumento 200x)

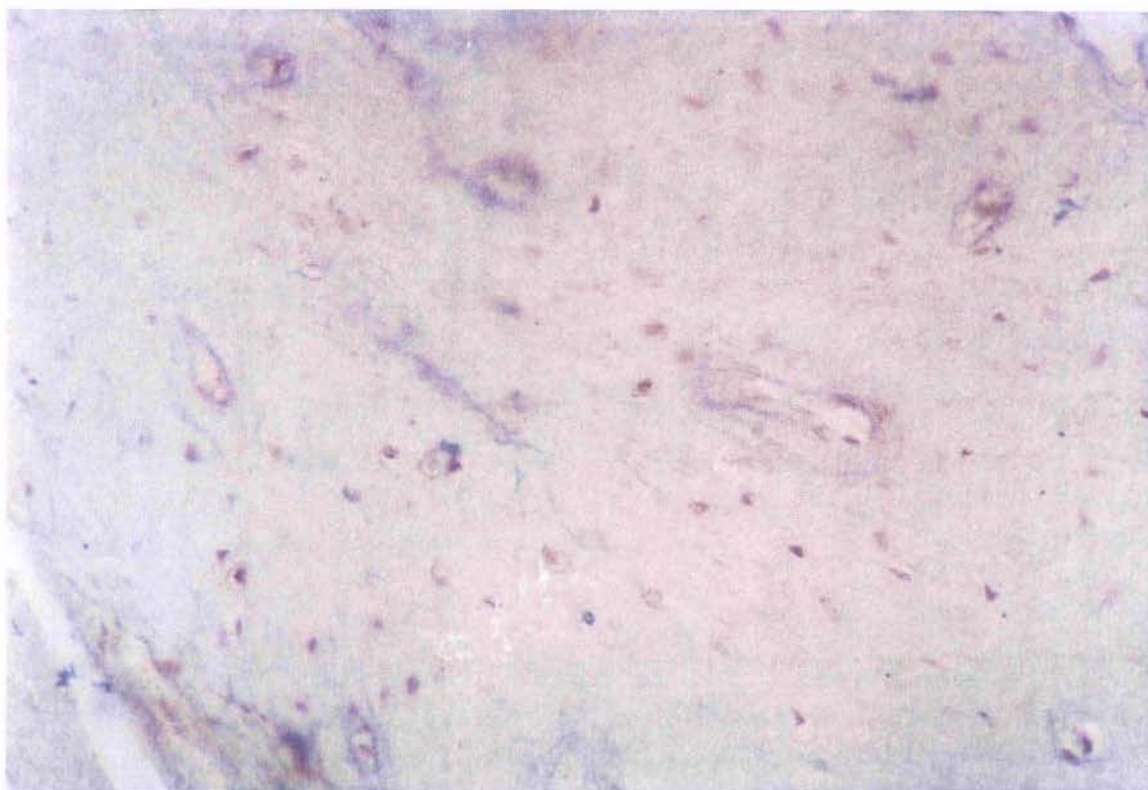


Foto 17: VIP moderadamente positivo, score 2, controle 28 dias (aumento 200x)

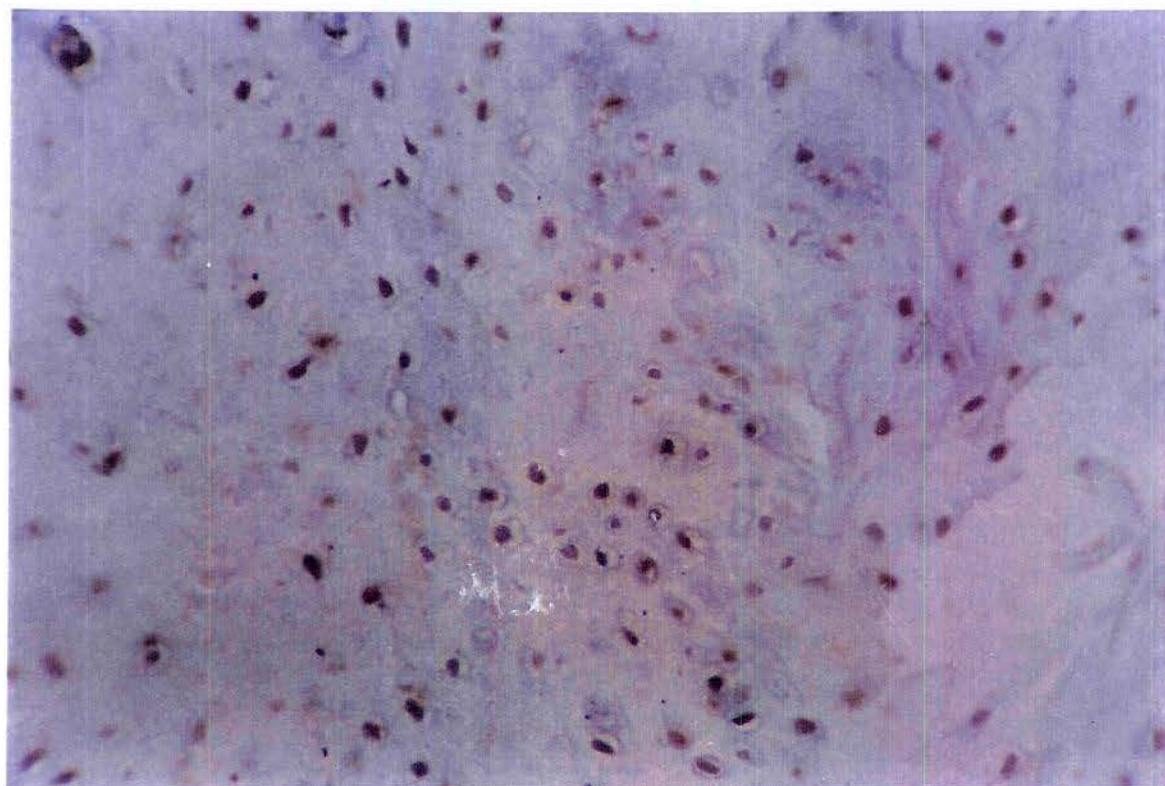


Foto 18 : VIP intensamente positivo, score 3, controle 28 dias (aumento 200x)

SUBSTÂNCIA P (SP)

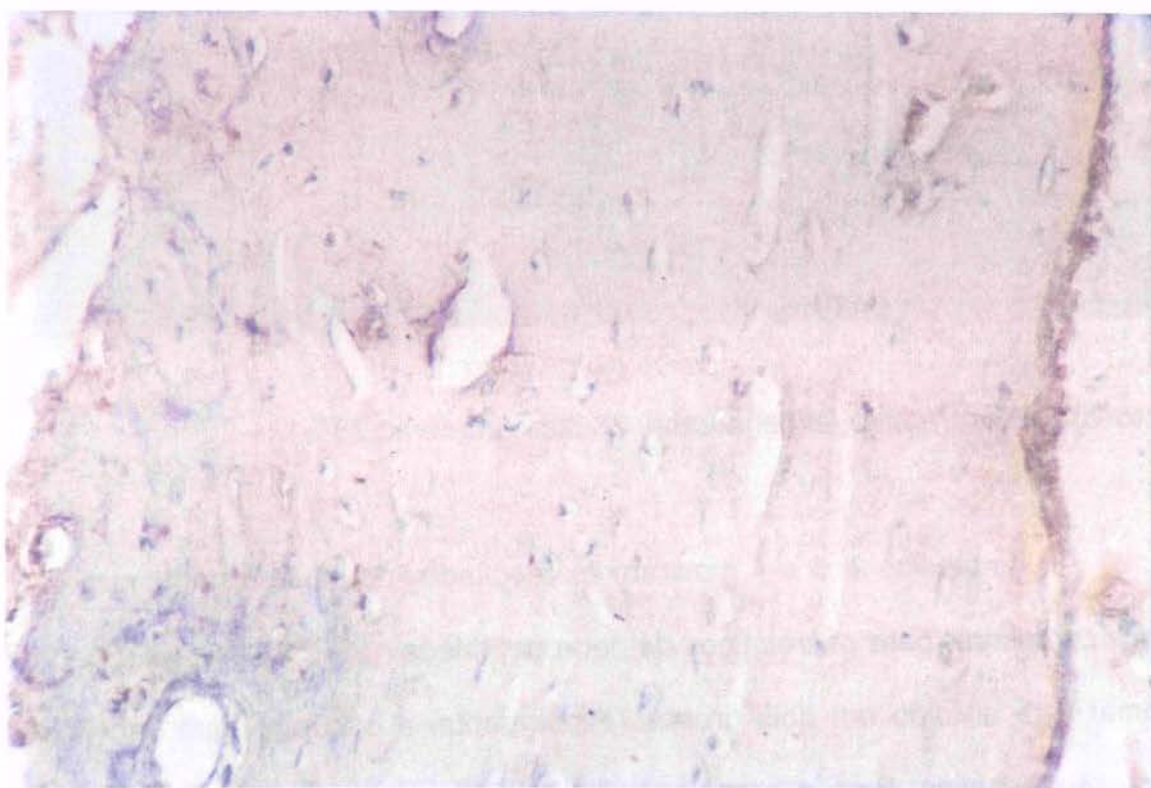


Foto 19: SP score zero, controle 28 dias (aumento 200x)



Foto 20: SP score zero, experimental, 28 dias (aumento 200x)

As tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados da imunohistoquímica de todos os animais para os três tipos de neuropeptídeos (CGRP, VIP e SP). Cada animal está dividido em dois grupos (experimental e controle) para sacrifício com 14 e 28 dias. Para o grupo com sacrifício no dia zero possui apenas o grupo controle. Os animais de 1 a 7 foram considerados o grupo controle (tabela 2). Os animais de 8 a 14 foram sacrificados com 14 dias (tabela 3) e os animais de 15 a 21 foram sacrificados com 28 dias, onde as ligaduras permaneceram do dia zero até os respectivos sacrifícios em cada grupo (tabela 4), sendo estes grupos os experimentais.

No dia 14 os neuropeptídeos CGRP e VIP estavam presentes, embora não houvesse diferença significativa entre as áreas controles e experimentais. No dia 28 os neuropeptídeos CGRP e VIP estavam presentes e havia um aumento significativo nas áreas controles quando comparados com as áreas experimentais ($p < 0.05$). O neuropeptídeo SP não foi encontrado em nenhuma das biópsias tanto para o dia zero, 14 e 28.

TABELA 2: RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O CGRP, VIP E SP NO DIA ZERO SEM LIGADURA

	CGRP	VIP	SP
Animal	Controle	Controle	Controle
1	1	1	0
2	1	1	0
3	2	1	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	1	0
7	1	2	0
Média	0.71	0.85	0

TABELA 3: RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O CGRP, VIP E SP COM 14 DIAS DE LIGADURA

Animal	CGRP		VIP		SP	
	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.
8	2	0	1	1	0	0
9	1	1	2	2	0	0
10	0	0	2	3	0	0
11	0	0	2	1	0	0
12	1	0	2	1	0	0
13	0	0	1	2	0	0
14	1	2	1	1	0	0
Média	0.71	0.42	1.57	1.57	0	0
DP	0.75	0.78	0.53	0.78	0	0

Exp. Experimental. Cont. Controle.

TABELA 4: RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O CGRP, VIP E SP COM 28 DIAS DE LIGADURA

Animal	CGRP		VIP		SP	
	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.
15	0	2	2	2	0	0
16	0	1	2	2	0	0
17	0	0	2	3	0	0
18	0	1	2	3	0	0
19	0	0	2	3	0	0
20	1	2	2	2	0	0
21	0	0	0	2	0	0
Média	0.14*	0.85	1.71 ^Y	2.42	0	0
DP	0.37	0.89	0.75	0.53	0	0

Exp. Experimental. Cont. Controle.

* $p < 0.05$ comparando exp. x cont. CGRP

^Y $p < 0.05$ comparando exp. x cont. VIP

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo imunohistoquímico foi avaliar a presença e as mudanças nos níveis dos neuropeptídeos (CGRP, VIP, SP) em tecido ósseo saudável e em tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura em ratos, visto que os neuropeptídeos podem participar no processo inflamatório levando à destruição de osso e colágeno.

O sistema nervoso, também, pode influenciar a patogênese da doença periodontal, através de substâncias neurotransmissoras. Estas são capazes de induzir, diminuir ou aumentar as reações inflamatórias, atuando em células do sistema imunológico, como linfócitos Te B, e células comuns de defesa celular, como os PMNs (KIERMAN, 1975, GAZELIUS et al., 1987; PANERAI & SACERDOTE, 1993).

Os neuropeptídeos são substâncias que interagem com os neurotransmissores acetilcolina e noradrenalina. Estão relacionados com os nervos sensoriais e autônomos. Eles são produzidos nos ribossomos do corpo celular e são encontrados em vesículas isoladas que se situam nas extremidades das fibras nervosas, onde os mesmos são liberados em quantidades pequenas. Sua potência chega a ser mil ou mais vezes superior que os outros neurotransmissores.

Existem vários modelos de estudo de patogenia em animais. Um dos

mais conhecidos é o da periodontite induzida por ligaduras. Esse modelo foi avaliado por JOHNSON (1975) E SALLUM (1982) em ratos, KARRING et al. (1993) e LINDHE & SUAMBERG (1974) em cães, PAGE (1991) em macacos, FISCHER (1993) em furões e PAGE & SCHOREDER (1982) em outros animais. Mesmo assim, os modelos animais não podem ser considerados como ideais, pois os mesmos não reproduzem a patogenia, evolução e severidade das doenças periodontais, idênticas às dos humanos. Entretanto são de grande valia, pois podemos obter um modelo experimental do processo da doença periodontal mais controlado, produzir defeitos de iguais dimensões, executar biópsias do periodonto de sustentação (PAGE & SCHOROEDER, 1982). Em ratos, as condições anatômicas, fisiológicas e imunológicas são bem próximas às dos humanos. Através da colocação de ligadura ao redor do dente, o acúmulo de placa bacteriana pode desenvolver uma inflamação inicial, e posteriormente, com a progressão da inflamação, ocasionar uma periodontite. Por esses motivos, o rato foi o animal escolhido no presente estudo.

6.1-HISTOPATOLOGIA

Em virtude da pesquisa comparar áreas saudáveis e patológicas, o estudo da histopatologia foi incluído para demonstrar a presença de saúde gengival ou doença periodontal nas biópsias (EKBLAD et al., 1984). Os cortes histológicos demonstraram que as biópsias das áreas experimentais tiveram sempre um achado de moderado infiltrado inflamatório inespecífico (n=5) e

acentuado (n=2) para o grupo com sacrifício de 14 dias (quadro 2) e um achado de leve infiltrado inflamatório inespecífico (n=1) e moderado (n=6) para o grupo com sacrifício de 28 dias (quadro 3). As biópsias das áreas controle no dia zero tiveram um predomínio de tecido normal (n=4) e um pequeno número de leve infiltrado inflamatório inespecífico (n=3) (quadro 1). As biópsias controle nos dias zero, 14 e 28 que manifestaram um leve infiltrado inflamatório não apresentavam perda óssea visível nas radiografias (tabela 1). Provavelmente, havia um infiltrado inflamatório sub-clínico. Essa fase é denominada de fase precoce segundo SCHOROER & PAGE, (1972). Animais com mais de 100 dias de vida podem desenvolver doença periodontal natural, ocasionada por bactérias e impacção de pelos (PAGE & SCHOROEDER, 1982). No presente trabalho isso não foi observado. Aparentemente, a análise histopatológica demonstrou que as biópsias experimentais e controles selecionadas para o estudo possuíam um padrão compatível com a seleção realizada.

6.2-DADOS RADIOGRÁFICOS

O estudo radiográfico foi incluído para corroborar os achados da histopatologia, visto que, em ratos, fica impossível fazer exames clínicos como sondagen gengival, índice de sangramento e nível de inserção de sondagem. Podemos observar na tabela 1 que as áreas de tecido ósseo saudável não apresentavam imagem compatível de perda óssea quando comparados com as áreas patológicas onde apresentavam imagem compatível com perda óssea.

Aos 14 dias há perda óssea significativamente maior ($p < 0.05$) nos grupos experimentais quando comparados com os grupos controle. Aos 28 dias há, também, perda óssea significativamente maior ($p < 0.05$) nos grupos experimentais quando comparados com os grupos controle. Quando comparamos os grupos dos 28 dias com os de 14 nas áreas experimentais, há perda óssea estatisticamente significativa para o grupo de 28 dias ($p < 0.05$) (tabela 1). Desta forma, podemos confirmar que as ligaduras induziram a periodontite, como os outros estudos demonstraram (PAGE, 1991).

6.3-IMUNOHISTOQUÍMICA

É sabido que a doença periodontal é placa dependente (LOE et al., 1965). Entretanto, o diagnóstico de atividade da doença ainda é um problema. A patogênese periodontal pode envolver inúmeros mecanismos, e cada um pode apresentar um potencial diagnóstico importante. Assim sendo, o presente estudo poderia oferecer mais um ponto importante no entendimento da patologia periodontal.

A ocorrência de peptídeos biologicamente ativos, dentre eles o CGRP, o VIP e o SP (BURSNTOCK, 1987; GAZELIUS et al., 1987) e outros neuropeptídeos neuronais químicos tem sido recentemente descrita em gengiva normal de humanos (TEIXEIRA, 1997). Tem sido demonstrado que esses peptídeos bioativos estão localizados em estruturas neuronais e não neuronais. Muitos deles têm originariamente sido considerados como tendo efeitos

hormonais. No entanto, evidências obtidas através de estudos morfológico e fisiológico mostram que pelo menos alguns podem atuar como neuromoduladores e ou neurotransmissores (COONS, 1958).

Os neuropeptídeos CGRP, VIP e SP são descritos como encontrados na lâmina própria gengival de humanos, ao redor de vasos sangüíneos e nervos (COONS, 1958; DHALL et al., 1986; TEIXEIRA, 1997). Nas tabelas 5, 6 e 7 podemos observar que os neuropeptídeos CGRP e VIP estão presentes no tecido ósseo normal e no tecido ósseo da doença periodontal induzida por ligaduras, e que nos tecidos controles foi observada uma tendência a valores maiores que os correspondentes dos tecidos experimentais. Isso poderia ser explicado por um consumo maior dessas substâncias no processo destrutivo. O neuropeptídeo SP não foi observado nem na área controle nem na experimental. Esse achado, provavelmente, não deve ser considerado um defeito na técnica, pois existe um controle interno onde foi observada marcação no conjuntivo e epitélio. Outra possibilidade para essa observação pode ser a técnica de imunohistoquímica utilizada. Os trabalhos anteriores (BERNICK, 1957; COONS, 1958; DIXON, 1962; BLOOM & EDWARDS, 1980; EDWALL et al., 1985; DHALL et al., 1986; AARESTRUP et al., 1995) usaram a técnica de congelamento a fresco, enquanto que no presente estudo foi usada a técnica de fixação em formol. Na técnica utilizada nesse trabalho perde-se na qualidade da marcação, mas ganha-se na preservação do material (BECAK & PAULETE, 1976). Resultados diferentes em relação à marcação para estes neuropeptídeos podem ser explicados através

da técnica da imunohistoquímica método Avidina-Biotina, pois o mesmo nos permite uma maior preservação do material, visto que as biópsias são fixadas e incluídas em parafina e cortadas em um micrótomo. Quando utilizamos a técnica a fresco, temos uma melhor marcação, porém perdemos na qualidade de preservação de tecidos íntegros que são cortados em um creostato (BECAK & PAULETE, 1976). A presença de marcação não pode ser considerada como uma reação cruzada, uma vez que não é relatada pelo fabricante existência da mesma em osteócitos e osteoblastos. Além disso, foi realizado controle negativo que não demonstrou reação cruzada.

6.3.1- Imunohistoquímica para o neuropeptídeo CGRP

Neuropeptídeo CGRP vem sendo mostrado coexistindo na subpopulação de neurônios do sistema nervoso sensorial (GAZELIUS et al., 1987; BARTOLD et al., 1994). O CGRP interage com o neurotransmissor ATP e NA (LOE et al., 1965; LUNDEBERG et al., 1985; LUTHMAN et al., 1988; LUTHMAN et al., 1988) e é encontrado em vesículas isoladas ou próximo aos demais neurotransmissores. Seu papel ainda não está totalmente comprovado. Entretanto, alguns trabalhos indicam que ele possa atuar no processo inflamatório gengival e periodontal (COONS, 1958; PERNOW, 1983).

O neuropeptídeo CGRP tem sido relatado na gengiva humana (AARESTRUP et al., 1995), gengiva hiperplásica induzida por fenitoína (COONS, 1958), vasos sanguíneos (LUTHMAN et al., 1988, LUTHMAN et al.,

1992; TEIXEIRA, 1997) e no tecido conjuntivo (LUTHMAN et al., 1988; ITOTAGAWA, 1990; TEIXEIRA, 1997). O CGRP participa nos processos de vasodilatação facilitando a dispersão de produtos oriundos da placa e do hospedeiro do sangue para os tecidos e para o sulco (GRUTZNER et al., 1992; HEYERAAS et al., 1993; FRISTAD et al., 1994; KEREZODIS et al., 1994; REED & BYERS, 1994). Atua ainda sobre macrófagos e leucócitos (REED & BYERS, 1994) e na diminuição do plasma neurogênico (proteínas plasmáticas que agravam o processo inflamatório), beneficiando preventivamente a inflamação oral e procedimentos invasivos dentais (GRUTZNER et al., 1992; HEYERAAS et al., 1993; FRISTAD et al., 1994; KEREZODIS et al., 1994; REED & BYERS, 1994).

O CGRP tem um potente efeito nos leucócitos, macrófagos, neutrófilos e, especialmente, monócitos. A presença de CGRP na gengiva pode difundir a inflamação para outras áreas e outros sítios dos dentes. Com isso, a inflamação gengival pode ter alguma causa na resposta vascular potencializando a inflamação neurogênica (TEIXEIRA, 1997).

No presente estudo, foi possível detectar a presença do neuropeptídeo CGRP em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo saudável e em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura, ao redor de vasos sanguíneos e nervos (tabela 2, 3 e 4). Aos 14 dias não foi possível observar diferenças significativamente estatísticas entre as áreas controles e experimentais (tabela 3). Aos 28 dias foi possível detectar na área experimental sua presença nas mesmas regiões que nas áreas controle

em quantidade significativamente menores ($p < 0.05$) (tabela 4). Estudos analisaram outros tecidos, tais como, gengiva normal em áreas com periodontite (AARESTRUP et al., 1995; TEIXEIRA, 1997), fluido gengival de pacientes com periodontite (LUNDY et al., 1999). Nestes estudos a mesma tendência de diminuição do CGRP foi encontrada nas áreas experimentais quando comparados com as áreas controles.

6.3.2- Imunohistoquímica para o neuropeptídeo VIP

O neuropeptídeo VIP vem sendo relatado nas fibras parassimpáticas junto com a acetilcolina (BURNSTOCK, 1987; GAZELIUS et al., 1987). Ele é encontrado nas mesmas regiões descritas para o marcador CGRP. É capaz de fazer uma importante ligação entre o sistema nervoso e o imunológico (KIERMAN, 1975).

O neuropeptídeo VIP pode atuar mais inicialmente nos estágios da gengivite, causando vasodilatação (BURNSTOCK, 1987; LUNDEBERG, 1989), facilitando a dispersão de produtos oriundos da placa e do hospedeiro do sangue para os tecidos e para o sulco e promovendo quimiotaxia de monócitos, cuja disfunção está relacionada com a periodontite juvenil localizada, periodontite de progressão rápida e periodontite pré-púbere (CARRANZA, 1992). A perda óssea rápida e acentuada (CARRANZA, 1992) observada nesses tipos de periodontite pode estar associada a este neuropeptídeo que atua na reabsorção óssea (LUTHMAN et al., 1989).

O VIP relaciona-se com a imunidade, podendo inibir a síntese de DNA pelos linfócitos (STANISZ, 1987; PANERAI & SACERDOTE, 1993), células de defesa imunológica presentes desde fases iniciais da gengivite até as lesões periodontais avançadas. Assim, estas células imunológicas não proliferam de forma a colaborarem na supressão do processo inflamatório gengival, o que podemos associar à progressão da doença e à dificuldade do hospedeiro em se defender (LINDHE, 1989).

No presente estudo, foi possível detectar a presença do neuropeptídeo VIP em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo saudável e em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo da periodontite induzida por ligadura, ao redor de vasos sangüíneos e nervos (tabela 2, 3 e 4). Aos 14 dias não foi possível observar diferenças significativamente estatísticas entre as áreas controles e experimentais (tabela 3). Aos 28 dias foi possível detectar na área experimental sua presença nas mesmas regiões que nas áreas controle em quantidade significativamente menores ($p < 0.05$). (tabela 4). Da mesma maneira que o neuropeptídeo CGRP, a comparação com outros estudos é difícil, pois existe pouca literatura a respeito. No entanto, TEIXEIRA (1997) demonstrou a mesma tendência na diminuição do VIP nas áreas com periodontite quando comparados com as áreas de gengiva normal.

6.3.3- Imunohistoquímica para o neuropeptídeo SP

O neuropeptídeo SP é mostrado tendo uma relação com os neurônios do Sistema Nervoso Central (BURNSTOCK, 1987; GAZELIUS et al., 1987). Este neuropeptídeo interage com ATP e NA (LOE et al., 1965; LUNDEBERG et al., 1985; LUTHMAN et al., 1988; LUTHMAN et al., 1988). Suas funções sugerem o seu envolvimento na patogenia da doença periodontal, como: 1) efeitos quimiotáticos para neutrófilos (FRISTAD et al., 1994; SUGAYA et al., 1995) (células de defesa com capacidade fagocítica e destrutiva), 2) vasodilatação (facilitando a dispersão de substâncias) (MURAYAMA et al., 1994; NÄRHI, 1989; SUGAYA et al., 1995) 3) extravasamento de plasma na inflamação neurogênica (em sua maior parte formado por proteínas plasmáticas que, aumentadas, elevam o processo inflamatório) (BARTOLD et al., 1994; FRISTAD et al., 1994), 4) ação sobre macrófagos, principalmente, nos estágios iniciais das gengivites, caracterizados pela presença de infiltrado de células inflamatórias.

Algumas funções estão mais relacionadas com a periodontite do adulto, a periodontite de progressão rápida e a periodontite juvenil, sendo: indução sobre os mastócitos a liberarem histamina (substância aumentada em lesões gengivais de longa duração, aumentando a vasodilatação e a permeabilidade) (BURNSTOCK, 1987; STANISZ, 1987; NÄRHI, 1989; BARTOLD et al., 1994; KEREZOUDIS et al., 1994; SUGAYA et al., 1995), mitose celular (BARTOLD et al., 1994), cicatrização (estimulando proliferação e

conexão celular nas etapas finais da doença) (LUTHMAN et al., 1988) e atua sobre monócitos (cuja disfunção está associada com a destruição rápida dos tecidos periodontais).

Está relacionado juntamente com o neuropeptídeo VIP no aumento da síntese de DNA (STANISZ, 1987; BARTOLD et al., 1994; SUGAYA et al., 1995), pelos linfócitos, na síntese de IgA e IgM e, também, modula respostas imunes nos tecidos mucosos, colaborando, então, para a diminuição dos processos inflamatórios gengivais e periodontais, através da imunidade (STANISZ, 1987; BARTOLD et al., 1994; SUGAYA et al., 1995).

Somando-se estas funções e relacionando-as com o processo inflamatório gengival e periodontal, observamos que o neuropeptídeo SP é uma substância pró-inflamatória (LUTHMAN et al., 1989), podendo induzir inicialmente, aumentar tais processos já iniciados e, também, podendo diminuí-los através da indução de fatores da imunidade.

É relatado na literatura que O SP é encontrado similarmente com os neuropeptídeos CGRP e VIP no tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e nervos.

No entanto, TEIXEIRA (1997) demonstrou a presença de SP em concentrações menores nas áreas com periodontite quando comparados com as áreas de gengiva normal. No presente estudo não foi possível observar marcação em osteócitos e osteoblastos em tecido ósseo para as áreas controles e experimentais (tabela 2, 3 e 4).

Maiores estudos deverão ser feitos tentando mapear esses neuropeptídeos nos demais tecidos do periodonto para verificar as alterações

quantitativas nesses e outros neuropeptídeos, e esclarecer o possível papel no processo patogênico da doença periodontal.

CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

1. Neste estudo foi possível identificar a existência dos neuropeptídeos CGRP, e VIP em osteócitos e osteoblastos do tecido ósseo, tanto nas áreas experimentais e controles.
2. Aos 14 dias, foi possível identificar que o neuropeptídeo VIP está nas mesmas concentrações, nas áreas experimentais quando comparadas com as áreas controles.
3. Aos 14 dias, foi possível identificar que o neuropeptídeo CGRP está aumentado quantitativamente, sem diferenças estatísticas, nas áreas experimentais quando comparadas com as áreas controles.
4. Aos 28 dias, foi possível identificar que os neuropeptídeos CGRP, e VIP estão significativamente diminuídos quantitativamente($p < 0.05$) nas áreas experimentais quando comparadas com as áreas controles.
5. Nos dias zero, 14 e 28 não foi possível identificar o neuropeptídeo SP tanto nas áreas experimentais como nos sítios controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AARESTRUP, F.M.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; SARNO, E.N. The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **28**: 1069-76, 1995.
2. BARJA, F. et al. Substance P containing nerve fibers in large peripheral blood vessels of the rat. **Cell Tissue Res.**, Seacancus, **229**: 411-22, 1983.
3. BARTOLD, P.M.; KYLSTRA, A.; LAWSON, R. Substance P: an and biochemical study in human gingival tissues. A role for neurogenic inflammation? **J. Periodontol.**, Chicago, **65**: 1113-21, Dec. 1994.
4. BECAK, W & PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1-2
5. BERNICK, S. Innervation of teeth and periodontium after enzymatic removal of collagenous elements. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, **10**: 323-32, 1957.
6. BLOOM, S.R. & EDWARDS, A.V. Vasoactive intestinal peptide in relation to atropine resistant vasodilatation in the submaxillary gland of the cat. **J. Physiol. (London)**, **300**: 41-53, 1980.
7. BURNSTOCK, G. Autonomic neuroeffector junctions-reflex vasodilatation of the skin. **J. Invest. Dermatol.**, New York, **69**: 47-57, 1977.

* De acordo com a NB66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

8. BURNSTOCK, G. Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. **J. Physiol. (London)**, **313**: 1-35, 1981.
9. _____. Nervous control of smooth muscle by transmitters cotransmitters and modulators. **Experientia**, Basel, **41**: 869-74, 1985.
10. _____. The changing face of autonomic neurotransmission. **Acta Physiol. Scand.**, Oxford, **126**: 67-91, 1986.
11. _____. Mechanism of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, **10**(Suppl.12): 574-81, 1987.
12. CARRANZA JR, F.A. **Periodontia clínica**. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 754p.
13. COHEN-COLE, S. et al. Psychosocial, endocrine, and immune factors in acute necrotizing ulcerative gingivitis. **Psychosom. Med.**, Baltimore, **43**: 43-91, 1981.
14. COONS, A.H. Fluorescent antibody methods. In: DANIELLI, J.F. **Cytochemical methods**. New York, Academic Press, 1958. p.399-422.
15. DHALL, U.; COWEN, T.; HAVEN, A.J.; BURNSTOCK, G. Perivascular noradrenergic and peptide-containing nerves show different patterns of changes during development and aging in the guinea-pig. **J. Auton. Nerv. Syst.**, Amsterdam, **16**: 109-26, 1986.

16. DIXON, A.D. The position, incidence and origin of sensory nerve terminations in oral mucous membrane. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, **7**: 39-48, 1962.
17. EDWALL, B. et al. Neuropeptide Y (NPY) and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. **Acta Physiol. Scand.**, Oxford, **125**: 253-64, 1985.
18. EKBLAD, E. et al. Neuropeptide Y coexist and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibres. **Regul. Pept.**, Amsterdam, **8**: 225-35, 1984.
19. ELIAS, J.M. **Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis.** Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1990.
20. FISCHER, RG. **The Ferret in periodontal research: Clinical features, histology, microbiology and immunosuppression (cyclosporin-A).** 1993. [Tese (Doutorado em Periodontia) - Lund University].
21. FRISTAD, I.H.; KARIN J.; KVINNSLAND, I. Nerve fibers and cells immunoreactive to neurochemical markers in developing rat molars and supporting tissues. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, **39**: 633-46, 1994.
22. FURNESS, J.B. et al. Substance p-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. **Neuroscience**, Oxford, **7**: 447-59, 1982.
23. GAZELIUS, B. et al. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. **Acta Physiol. Scand.**, Oxford, **130**: 33-40, 1987.

24. GENCO, R.J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodontol.**, Chicago, **63**: 338-55, Apr. 1992.
25. GIBBINS, I.L. et al. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous vascular and visceral sensory neurons of guinea-pigs. **Neurosci. Lett.**, Limerick, **57**: 125-30, 1985.
26. GRUTZNER, E.H.; GARRY, M.G.; HARGREAVES, K.M. Effect of Injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and immunoreactive calcitonin gene-related peptide. **J. Endod.**, Baltimore, **18**: 553-7, 1992.
27. GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 864p.
28. HART, T.C.; SHAPIRA, L.; VAN DYKE, T.E. Neutrophil defects as risk factors for periodontal diseases. **J. Periodontol**, Chicago, **65**: 521-9, May 1994.
29. HEYERAAS, K.J.; KVINNSLAND, I.; BYERS, M.R.; JACOBSEN, E.B. Nerve fibers immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene-related peptide, substance P and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament, and gingiva in cats. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, **51**:207-21, 1993.
30. ITOTAGAWA, T. Immunohistochemical studies on the peptidergic nerve distribution in hard palate mucosa and gingiva of the rats. **Osaka Daigaku Shigaku Zasshi**, **35**:78-92, 1990.

31. JOHNSON, I.H. Effects of local irritation and dextran and sulphate administration on the periodontium of the rat. **J. Periodont. Res., Copenhagen, 10: 332-45, 1975.**
32. KARRING, T.; NYMAN S.; GOTTLow, J.; LAYRED L. Development of biological concept of guided tissue regeneration. **Periodontology 2000, Copenhagen, 1: 26-35, 1993**
33. KEREZoudis, N.P.; OLGART, L.; EDWALL, L. Involvement of substance P but not nitric oxid or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip. **Arch. Oral Biol., Oxford, 39: 769-74, 1994.**
34. KIERMAN, J.A. A pharmacological and histological investigation of the involvement of mast cells in cutaneous axon reflex vasodilatation. **Q J. Exp. Physiol., London, 60: 123-30, 1975.**
35. KJARTANHSON, J. & DALSGAARD, C. Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. **Eur. J. Pharmacol., Amsterdam, 42: 355-8, 1987.**
36. LEE, Y. et al. Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. **Neuroscience, Oxford, 15: 1227-37, 1985.**
37. LEVINE, J.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BASBAUM, A.I. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. **J. Immunol., Baltimore, 135: 843-7, 1985.**

38. LINDHE, J & SUANBERG, G. Influence of trauma from occlusion progression of experimental periodontitis in the beagle dog. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, 1: 3-14, 1974.
39. _____. **Tratado de periodontologia clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1989.
41. LUNDEBERG, J.M. Evidence for coexistence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands. Morphological, biochemical and functional studies. **Acta Physiol. Scand.**, Oxford, 496(suppl.): 1-57. 1981.
42. _____. Peptidergic Control of the autonomic regulation system in the orofacial region. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, 85:239-50, 1989.
43. _____. et al. Coexistence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and broncho-constrictor effects of capsaicin. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, 108: 315-9, 1985.
44. LUNDY, F.T. et al. Calcitonin gene related peptide in gingival crevicular fluid in periodontic health and disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, 26: 212-6, 1999.
45. LUTHMAN, J. et al. Immunohistochemical studies of the neurochemical markers in human gingiva with phenytoin-induced overgrowth. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, 96: 339-46, 1988.
46. _____. et al. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis-affected sites. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, 24: 267-78, 1989.

47. _____. et al. Immunohistochemical studies of the neurochemical markers, CGRP, enkephalin, galanin, γ -MSH, NPY, PHI, proctolin, PTH, somatostatin, SP, VIP, tyrosine hydroxylase and neurofilament in nerves and cells of the human attached gingiva. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, **33**: 149-58, 1988.
48. LUTHMAN, J.; LUTHMAN, D.; HÖKFELT, T. Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, **37**: 193-208, 1992.
49. MAEDA, T. et al. Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. **Cell Tissue Res.**, Seacancus, **249**: 13-23, 1987.
50. MAIA, F.M. **Cefalometria para o clínico geral e odontopediatria**. São Paulo, Santos, 1988.
51. MARTINEZ, I.R. & PEKARTHY, J.M. Ultrastructure of encapsulated nerve endings in rat gingiva. **Am. J. Anat.**, New York, **140**: 135-8, 1974.
52. MURAYAMA, Y. et al. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: risk factors Involving host defense mechanisms. **Periodontology 2000**, Copenhagen, **6**: 116-24, 1994.
53. NÄRHI, M. Interaction between the autonomic and sensory nerves in the dental pulp. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, **85**: 389-93, 1989.
54. NOREVALL, L.I.; FORSGREN, S.; MATSSON, L. Expression of neuropeptides (CGRP, substance P) during and after orthodontic tooth movement in the rat. **Eur. J. Orthod.**, London, **17**: 311-25, 1995.

55. OFFENBACHER, S.; COLLINS, J.G.; AROLDI, R.R. New clinical diagnostic strategies based on pathogenesis of disease. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, **28**: 523-35, 1993.
56. OTTENHOFF, T.M. Putting numbers on mycobacterium activated T cells subsets. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, **104**: 381-3, 1996.
57. PAGE, R.C. & SCHOROEDER, H.E. **Periodontitis in man and other animals: a comparative review**. Basel, Karge;1982.
58. PAGE, R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, **26**: 230-42, 1991.
59. PANERAI, A.E. & SACERDOTE, P. Brain and gut neuropeptides in peripheral blood mononuclear cells. **J. Physiol.**, Cambridge **87**: 283-9, 1993.
60. PERNOW, B. Substance P - a putative mediator of antidromic vasodilatation. **Gen. Pharmacol.**, Exeter, **14**: 13-6, 1983.
61. RAMIERI, G. et al. The enervation of human teeth and gingival epithelium as revealed by means of an antiserum for Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5). **Am. J. Anat.**, New York, **189**: 146-54, 1990.
62. RANNEY, R.R. Classification of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, Copenhagen, **2**: 13-25, 1993.

63. REDD, P.E. & BYERS, M.R. Regeneration of junctional epithelium and its enervation in adult rats: a study using immunocytochemistry for p75 nerve growth factor receptor and calcitonin gene-related peptide. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, **29**: 214-24, 1994.

64. SALLUM, A.W. **Estudo da participação do trauma de oclusão na evolução da doença periodontal em ratos.** Piracicaba, 1982. [Tese (Livre Docente em Periodontia) – FOP-UNICAMP].

65. SANDHU, H.S.; HERSOKVITS, M.S.; SINGH, T.J. Effects of surgical sympathectomy on bone remodeling at incisor and molar root sockets. **Anat. Rec.**, New York, **219**: 32-8, 1987.

66. SANNINO, P & SHOUSA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave over processing. **J. Clin. Pathol.**, London, **47**: 90-2, 1994.

67. SCHROEDER, H.E. & PAGE, R.C. Lymphocyte fibroblast interactions in the pathogenesis of inflammatory gingival disease. **Experientia**, Basel, **28**: 1228-30, 1972.

68. SHEPHERD, S.R.; SIMS, T.N.; JOHNSON, B.W.; HERSHMAN, J.M. Assessment of stress during periodontal surgery with intravenous sedation and with local anesthesia only. **J. Periodontol.**, Chicago, **59**: 147-54, Mar. 1988.

69. STANISZ, A. et al. Neuropeptides and Immunity. **J. Am. Thorac. Soc.**, **136**: S47-S51, 1987.

70. _____, et al. Neuropeptides and Immunity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 136: 48-51, 1987.
71. SUGAYA, A.; CHUDLER, E.H.; BYERS, M.R. Axonal transport of fluorescent carbocyanine dyes allows mapping of peripheral nerve territories in gingiva. **J. Periodontol.**, : 817-21, Sept. 1995.
72. TEIXEIRA, H.G.C. **Neuropeptídeos em gengiva saudável e em periodontite do adulto**. Rio de Janeiro, 1997. 55p. [Dissertação (Mestrado em Odontologia, Periodontia) - Faculdade de Odontologia da UERJ].
73. TERENCEHI, G. et al. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in the tongue, epiglottis and pharynx of the rat: occurrence, distribution and origin. **Brain Res.**, Amsterdam, 365: 1-14, 1986.
74. UDDMAN, R. et al. Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene related peptide; trigeminal origin and co-existence with substance P. **Neurosci. Lett.**, Limerick, 62: 131-6, 1985.
75. WAKISAKA, S. et al. The distribution and origin of substance plike immunoreactivity in rat molar pulp and periodontal tissues. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, 30: 813-8, 1985.
76. WILSON JR, T.G., KORNMAN, K.S. **Fundamentals of periodontics**. Chicago, Quintessence Publishing, 1996. 564p.

APÊNDICE

APÊNDICE

**QUADRO 1: RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS
CONTROLES NO DIA ZERO.**

IDENTIF.	DESCRIÇÃO
R1-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal.
R2-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização e exocitose neutrofílica leve. CONCLUSÃO: Leve processo inflamatório inespecífico.
R3-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização e exocitose neutrofílica leve. CONCLUSÃO: Leve processo inflamatório inespecífico.

R4-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização e exocitose neutrofílica leve. CONCLUSÃO: Leve processo inflamatório inespecífico.
R5-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, sem alterações histológicas significativas, neutrófilos estromais discretos. CONCLUSÃO: Normal.
R6-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal.
R7-C0	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal.

Rx-C0= rato x biópsia controle dia zero.

**QUADRO 2: RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS
EXPERIMENTAIS E CONTROLES COM 14 DIAS.**

IDENTIF.	DESCRIÇÃO
R8-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, presença de grande número de mononucleares e neutrófilos (com exocitose acentuada). Hemácias extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Acentuado processo inflamatório inespecífico.
R8-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. Pequeno número de neutrófilos no conjuntivo. CONCLUSÃO: Normal
R9-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado, presença de pequeno número de mononucleares e neutrófilos. Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.

R9-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização CONCLUSÃO: Normal
R10-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de moderado número de mononucleares e neutrófilos (com exocitose moderada). Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial leve. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R10-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R11-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado, presença de moderado número de mononucleares e neutrófilos (com exocitose moderada). Hemácias levemente extravasadas, vascularização leve, hiperplasia epitelial leve. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R11-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio, sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal

R12-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de pequeno número de mononucleares e neutrófilos. Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R12-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado ceratinizado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. Pequeno número de neutrófilos no conjuntivo. CONCLUSÃO: Normal
R13-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de grande número de mononucleares e neutrófilos (exocitose neutrofílica acentuada). Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Acentuado processo inflamatório inespecífico
R13-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. Raros neutrófilos marginados. CONCLUSÃO: Normal

R14-E14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de grande número de mononucleares e neutrófilos (exocitose neutrofílica moderada). Hemácias levemente extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R14-C14	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. Pequeno número de neutrófilos no conjuntivo. CONCLUSÃO: Normal

Rx-E14 = rato x biópsia experimental com 14 dias

Rx-C14 = rato x biópsia controle com 14 dias

**QUADRO 3: RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS
EXPERIMENTAIS E CONTROLES COM 28 DIAS.**

IDENTIF.	DESCRIÇÃO
R15-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização exuberante, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R15-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R16-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R16-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal

R17-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado presença de mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R17-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R18-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso presença de pequeno número de mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização exuberante, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R18-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R19-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso presença de raros mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização moderada, hiperplasia epitelial moderada CONCLUSÃO: Leve processo inflamatório inespecífico.

R19-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R20-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso presença de mononucleares e neutrófilos. Hemácias extravasadas, vascularização exuberante, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R20-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal
R21-E28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso presença de mononucleares e neutrófilos (com exocitose). Hemácias extravasadas, vascularização exuberante, hiperplasia epitelial moderada. CONCLUSÃO: Moderado processo inflamatório inespecífico.
R21-C28	Biópsia de gengiva exibindo epitélio escamoso estratificado sem alterações histológicas significativas, discreto aumento da vascularização. CONCLUSÃO: Normal

Rx-E28 = rato x biópsia experimental com 28 dias

Rx-C28= rato x biópsia controle com 28 dias