



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

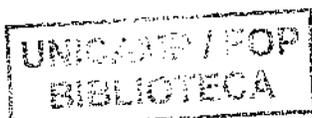
Monografia de Final de Curso

Aluna: Ana Carolina Borges de Freitas

Orientador: Prof^o. Dr. Francisco Carlos Groppo

Co-orientador: Prof^o. Dr. Fábio André dos Santos

Ano de Conclusão do Curso: 2009




Prof^o. Dr. Francisco Carlos Groppo - Orientador

12/04/09



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



TCC/UNICAMP
F884i
FOP

Ana Carolina Borges de Freitas

**Influência da doxíciclina e minociclina na doença periodontal
induzida por ligadura em ratos - Uma avaliação histológica,
histométrica e histoquímica.**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof^o. Dr. Francisco Carlos Groppo

Co-orientador: Prof^o. Dr. Fábio André dos Santos

PIRACICABA

-2009-

Unidade - FOP/UNICAMP

TCC / UNICAMP

F884i Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4979

C D

Proc. 16P-134/10

Preço ~~R\$~~ 11,00

Data: 13/08/10

R. 722836

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

F884i Freitas, Ana Carolina Borges de.
Influência da doxíciclina e minociclina na doença periodontal induzida por ligadura em ratos: uma avaliação histológica, histométrica e histoquímica. / Ana Carolina Borges de Freitas. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
26f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antimicrobianos. 2. Reabsorção óssea. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

*À minha mãe, pelo apoio
incondicional em todas as
etapas da minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida.

À minha mãe e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Francisco Carlos Groopo pelo ensinamento, incentivo e colaboração na realização desse projeto.

Ao meu co-orientador Prof^o. Dr. Fábio André dos Santos e a Dra. Márcia Thaís Pochapski pela ajuda e dedicação em todas as etapas desse projeto.

Aos amigos e colegas, em especial, Marina Passarella Desjardins, pela paciência e coloração.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	6
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVOS.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
ANÁLISE DOS DADOS.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1- Divisão dos animais dentro dos grupos de estudo.....	15
Figura 1- Aspecto da análise pelo software ImageTool Pro.....	16
Figura 2- Aspecto da análise do epitélio juncional pelo software ImageTool Pro.....	17
Figura 3- Reprodutibilidade intra-examinador das avaliações após duas análises em momentos distintos.....	20
Figura 4- Média e desvio padrão da perda óssea em mm ² após os diferentes tratamentos.....	21
Figura 5- Contagem percentual das células (média e erro padrão) após o período experimental.....	21
Figura 6- Fotomicrografias ilustrando as características histológicas e histoquímicas observadas.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **CMT**= Tetraciclina modificada quimicamente
- **DP**= Doença periodontal
- **Dx**= Doxicilina
- **F**= Fibroblasto
- **HE**= Hematoxilina-eosina
- **JCE**= Junção cimento-esmalte
- **LPS**= Lipolissacarídeos
- **Mn**= Minociclina
- **MN**= Mononuclear
- **MMPs**= Metaloproteína
- **PMN**= Polimorfonucleares
- **TRAP**= Fosfatase ácida tartarato resistente

Resumo

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a influência de duas tetraciclinas (doxiciclina - Dx e minociclina - Mn) na DP induzida por ligadura em ratos. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos: C (n=10) - sem ligadura; L (n=10) – com ligadura; Dx (n=10) – com ligadura + Dx; Mn (n=10) com ligadura + Mn. O período de avaliação foi de 30 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: avaliação histométrica e histológica (epitélio juncional, tecido conjuntivo e cemento radicular) e análise histoquímica - atividade dos osteoclastos por meio da enzima fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). A análise dos dados foi realizada com a ANOVA. A análise histométrica (distância entre a crista óssea e junção cemento esmalte) mostrou que o grupo L apresentou a maior medida ($p < 0,001$) e a menor medida foi observada no grupo C, sendo que os grupos Dx e Mn apresentaram médias semelhantes. A contagem percentual de PMN e MN mostrou-se maior no grupo L e menor no grupo C. A contagem de osteoclastos foi maior no grupo L e Mn e menor nos grupos C e Dx ($p < 0,05$). As características histológicas mostraram que os grupos L, Dx e Mn apresentaram epitélio juncional longo com ruptura na porção apical com infiltrado inflamatório subjacente. No grupo C o epitélio juncional estava intacto com um discreto infiltrado inflamatório subjacente. Foi observada no grupo L, reabsorção do osseo alveolar e cemento radicular, caracterizando perda de inserção periodontal. Características semelhantes foram observadas nos grupos Dx e Mn, porém em menor intensidade. Dentro dos limites da presente pesquisa, pode se concluir que tanto a doxiciclina quanto a minociclina apresentam potencial de reduzir a resposta inflamatória e conseqüente reabsorção óssea na doença periodontal induzida em ratos.

Palavras Chave: Doença Periodontal; Antimicrobianos; Resposta Inflamatória; Reabsorção óssea; TRAP.

Introdução

A doença periodontal (DP) caracteriza-se por um processo inflamatório que acomete os tecidos periodontais, levando a perda progressiva de inserção, com reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional, podendo causar a perda do elemento dental. Apresenta uma etiologia multifatorial, envolvendo fatores locais, principalmente o biofilme dental e fatores sistêmicos (alterações genéticas, doenças metabólicas, imunossupressoras, estresse e idade). O processo de destruição das estruturas de suporte (ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar), é resultado de repetidos surtos de atividade e subseqüentes períodos de estabilidade. Indivíduos podem apresentar surtos com maior ou menor freqüência, caracterizando assim, diferentes graus de susceptibilidade à doença. (Preshaw et al 2004; Salvi & Lang 2005).

O processo inflamatório observado na DP ocorre pela presença do biofilme dental, bem como pela resposta do hospedeiro a esse biofilme. A presença da microbiota estimula uma resposta do hospedeiro, devido à liberação de substâncias como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteitóico, fimbrias e proteases, que ativam o sistema imune. A resposta imuno-inflamatória frente aos agentes de virulência bacterianos é, portanto, responsável por grande parte da degradação da matriz extracelular dos tecidos periodontais. (AAP 2002).

Portanto, o estabelecimento inicial e a progressão da DP estão associados à presença do biofilme dental e seus produtos, pois ocorre o recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas que são fundamentais para a iniciação e manutenção do processo inflamatório. (Ryan & Golub 2002; McCauley & Nohutcu 2002; Preshaw et al. 2004; Salvi & Lang 2005).

À medida que o processo inflamatório da DP progride, as citocinas liberadas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 entre outras) ativam os também os

mecanismos de reabsorção óssea, caracterizando a degradação das estruturas periodontais com alteração do cimento radicular, destruição das fibras do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar (Ryan & Golub 2002; McCauley & Nohutcu 2002).

O tratamento convencional da periodontite inclui a remoção mecânica do cálculo e biofilme dental por meio da instrumentação radicular utilizando instrumentos manuais e/ou ultra-sônicos, associado a uma correta orientação de higiene bucal, bem como um programa de manutenção periódica. Considerando o papel da resposta do hospedeiro, a possibilidade de se promover alterações na mesma, frente aos agentes de virulência bacterianos, pode ser um coadjuvante ao tratamento periodontal convencional. Entre os objetivos das terapias para a modulação da resposta do hospedeiro está o bloqueio das vias responsáveis pela degradação dos tecidos periodontais, como por exemplo: citocinas pró-inflamatórias, mediadores envolvidos no processo de reabsorção óssea, produção excessiva de MMPs (metaloproteínas), metabólitos do ácido aracdônico e radicais livres (Ryan & Golub 2000; Llavaneras et al. 2001; Ramamurthy et al. 2002; Buduneli et al. 2004; Dumitrescu 2004; Breivik et al. 2005).

A modulação da resposta inflamatória pode ser combinada com a terapia periodontal tradicional, com essa finalidade são utilizadas drogas de uso local ou sistêmico como antiinflamatórios não esteroidais, bisfosfonados e tetraciclina. (Ryan et al 2000; McCauley & Nohutcu 2002; Gurgel et al. 2003; Buduneli et al. 2004).

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, usado no tratamento de processos infecciosos, inclusive na doença periodontal, devido a sua capacidade em inibir a síntese protéica bacteriana. Contudo, novas aplicações da tetraciclina

têm sido estudadas, como por exemplo, a capacidade de bloquear MMPs, inibição da liberação de citocinas, redução da reabsorção óssea, tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso central, redução de radicais livres e tratamento de neoplasias (Borderie et al. 2001; Ramamurthy et al. 2002; Kirkwood et al. 2003; Saikali & Singh 2003; Holmes et al. 2004; Wang et al. 2005).

Dentro da classe das tetraciclinas estão incluídas as clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, metaciclina, doxiciclina e minociclina. Essas substâncias promovem a remoção do cálcio, que é necessário para a ativação das MMPs. Outro mecanismo de atuação das tetraciclinas é a inativação de enzimas que ativam as MMPs, redução dos radicais livres, bloqueio da secreção de proteases lisossomais e modulação da função de osteoclastos, incluindo a indução e inibição da apoptose (Llavaneras et al. 2001; Ramamurthy et al. 2002; Buduneli et al. 2004; Dumitrescu 2004; Breivik et al. 2005).

O mecanismo de ação das tetraciclinas na modulação da resposta inflamatória parece ser independente de sua ação antimicrobiana. Tetraciclinas modificadas quimicamente (CMT) vêm mostrando resultados promissores na terapêutica associada ao tratamento da doença periodontal (Khodr & Khalil et al. 2001; Bezerra et al. 2002; Saikali & Singh 2003; Preshaw et al. 2004; Holmes et al. 2004).

Em estudos com animais, foi possível verificar em diferentes modelos experimentais, o papel nas tetraciclinas quimicamente modificadas (CMTs) na modulação de processos inflamatórios. Em dois estudos de Maitra et al. (2003 e 2005) com indução de sepsia em ratos, mostraram que as CMTs promovem uma redução das MMPs-2 e 9, caspase-3 e radicais livres, porém houve um aumento de inibidores de MMPs (TIMP-1).

Em modelo experimental de doença periodontal induzida em ratos, estudos de Llaneras et al. (2001), Ramamurthy et al. (2002), Bezerra et al. (2002) Buduneli et al. (2004), Mavragani et al. (2005), mostraram que as tetraciclina promoveram uma inibição da reabsorção óssea, modulando a liberação de citocinas, reduzindo a atividade das MMPs e tendo ação pró-apoptótica sobre os osteoclastos.

Objetivos

Após o tratamento com dosagem subclínica de doxiciclina e minociclina em ratos com indução de DP por ligaduras, essa pesquisa tem por objetivos:

a) Analisar as alterações histológicas e histométricas após a indução a doença periodontal e tratamento com as tetraciclinas, considerando o epitélio juncional, tecido conjuntivo, células inflamatórias, fibras e tecido ósseo, através de métodos qualitativos e quantitativos.

b) Verificar a atividade de osteoclastos pela avaliação da presença da enzima fosfatase ácida tartarato resistente.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, SPF****) com 60 dias de idade, pesando em média 200-270 gramas, provenientes do CEMIB – UNICAMP. Os mesmos foram divididos em 4 grupos (Tabela 1). A manipulação dos animais seguiu um protocolo de acordo com as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O procedimento para anestesia intraperitoneal foi feito utilizando solução de quetamina (75 mg/kg) e relaxante muscular xilasina (10 mg/kg). Este estudo foi aprovado em 26 de junho de 2006, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP (Protocolo número #1037-1).

A indução da doença periodontal foi feita após a anestesia, com a colocação de uma ligadura com fio de algodão esterilizado (Tex 34 Glace 50 – Lipasa – Brasil) nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, tomando cuidado para que o fio penetrasse no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (Bezerra et al. 2002; Achong et al. 2003; Susin & Rösing 2003; Galvão et al. 2003; Benatti et al. 2003; Gurgel et al. 2004). Vinte e quatro horas após a colocação das ligaduras foi iniciado o tratamento com as drogas doxiciclina e minociclina, sendo então administradas por via oral (6mg/kg) em 0,35ml/300g de doxiciclina (0,5%) e minociclina (0,5%) em veículo carboximetilcelulose a 1% (Ramamurthy et al. 2002). Nos grupos controles foram administrados apenas veículo, sendo que no controle negativo as ligaduras foram colocadas e retiradas, simulando apenas o trauma ocorrido durante a colocação. O período de avaliação foi de 30 dias, sendo o sacrifício feito por decapitação após sedação prévia com halotano.

Tabela 1 - Divisão dos animais dentro dos grupos de estudo.

Grupo	Número	Período (Dias)	Tratamento
L	10	30	Sem ligadura + CMC (Controle negativo)
CMC	10	30	Ligadura + CMC (Controle positivo)
Dx	10	30	Ligadura + Doxiciclina
Mn	10	30	Ligadura + Minociclina

Os animais receberam ração balanceada e água *ad libitum*, sendo mantidos durante todo o período experimental em uma sala com temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) sob ciclo de iluminação natural (ciclo claro-escuro) de 12/12 horas, com um número de 5 animais por gaiola.

Após o sacrifício, as mandíbulas, foram dissecadas e fixadas em formol tamponado a 10% durante 48 horas e a seguir descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 30%, trocando-se a solução a cada 48 horas por 14 dias.

Após lavagem por 24 horas em água corrente, as peças foram desidratadas (escala gradual de álcool em diferentes concentrações), diafanizadas e incluídas em parafina, sendo então, obtidos cortes seriados de $6\mu\text{m}$ de espessura (intervalo de $60\mu\text{m}$).

Nos cortes incluídos na análise histológica os molares apresentaram a câmara pulpar claramente identificada e polpa radicular íntegra. Foram obtidos cortes seriados sentido méso-distal, sendo realizadas as colorações com Hematoxilina – Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori. As lâminas confeccionadas com estes cortes foram utilizadas para avaliação do epitélio juncional, tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório, fibras e tecido ósseo (100x).

Para análise do tecido ósseo foram realizadas mensurações (mm) da junção cimento esmalte (JCE) até a crista óssea (aumento de 40x) nas faces

mesial e distal. A contagem de polimorfonuclear (PMN), mononuclear (MN) e fibroblasto (F) foi realizada em dez lâminas coradas por HE, para cada grupo experimental em um aumento final de 400x.

Todas as medidas histométricas foram realizadas com o software para a análise digital (Image Pro Plus® Version 4.5.0.29, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). As medidas foram tomadas em triplicada para cada corte, com o mesmo examinador sem conhecimento a que grupo a amostra pertencia. Antes das análises histométricas, foram realizados exames em dois momentos distinto das análises.

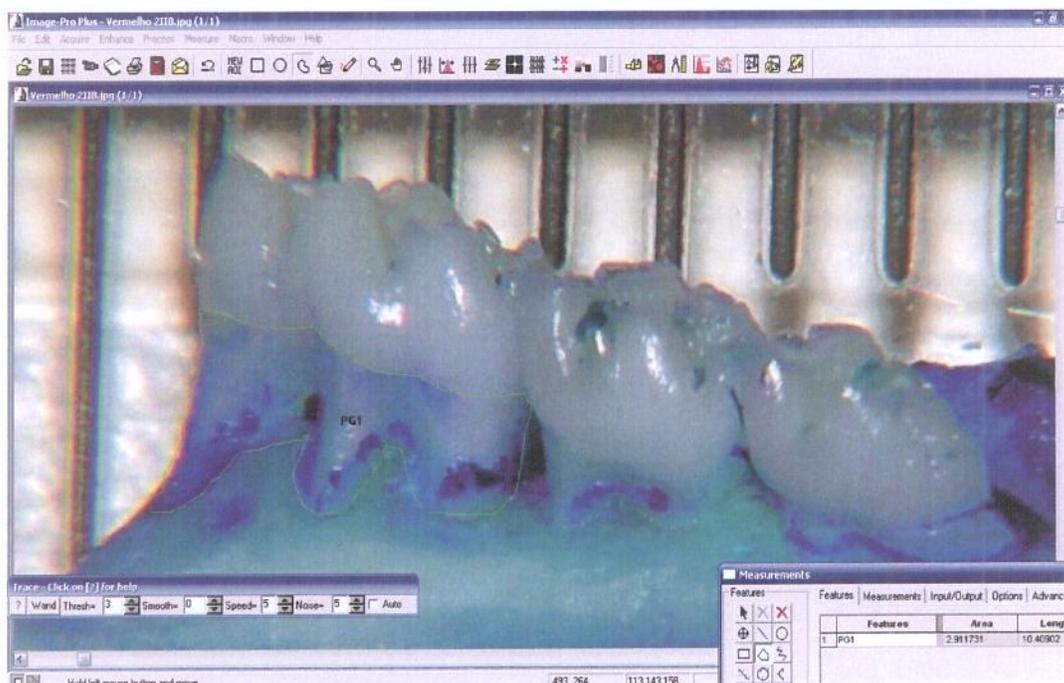


Figura 1- Aspecto da análise pelo software ImageTool Pro.

A análise da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), uma enzima lisossômica presente em osteoclastos que permite a identificação da atividade dessas células. Osteoclastos ativos são definidos pela presença de células TRAP – positivas na superfície óssea. Após a remoção da parafina dos cortes (xileno e álcool), as amostras foram incubadas por 2 horas com solução tampão

de tartarato em temperatura ambiente e em seguida aplicado o substrato de fosfatase ácida. As amostras foram lavadas com água destilada por 1 minuto e em seguida realizada a contra coloração com verde de metila 1% por 30 segundos em tampão fosfato cítrico a 0,1M. As lâminas foram lavadas três vezes com água destilada por 1 minuto cada. O resultado permitiu a visualização de osteoclastos Trap-positivos com o núcleo corado em vermelho. O número de osteoclastos Trap-positivos na superfície óssea foram contados em toda a extensão da área da furca com o auxílio do software Image Pro Plus®, sendo calculada a média para cada animal. As contagens foram tomadas em triplicada para cada corte, com o mesmo examinador sem conhecimento a que grupo pertencia a amostra. Foram realizados exames em dois momentos distintos com intervalo de uma semana a fim de testar a reprodutibilidade.

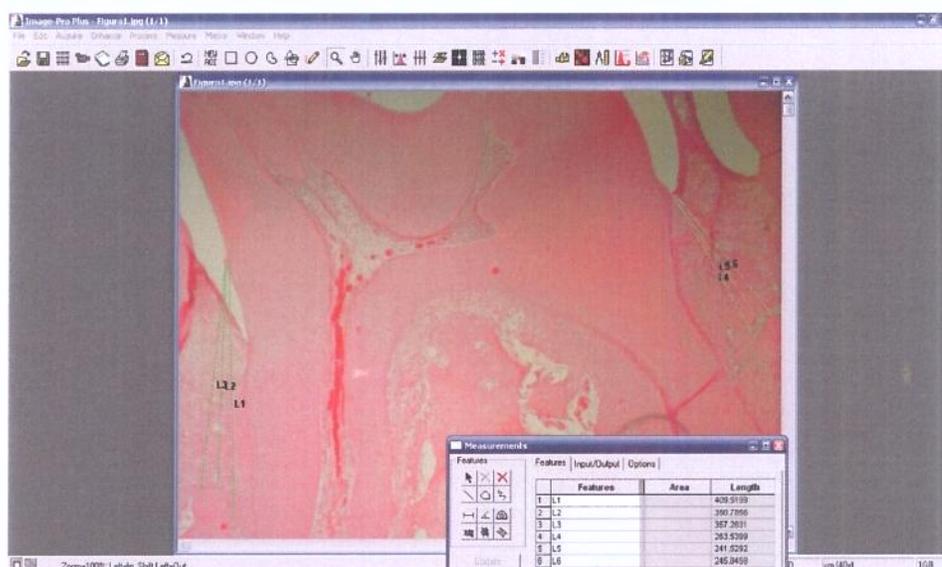


Figura 2- Aspecto da análise do epitélio juncional pelo software ImageTool Pro.

Análise dos dados

A reprodutibilidade dos dados para as variáveis quantitativas foi obtida por meio do procedimento de Bland & Altman (1999), verificando se a reprodução dos dados que se encontravam dentro dos limites de concordância. As análises foram conduzidas sempre pelo mesmo pesquisador.

Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA de um critério (*one way ANOVA*). Previamente a aplicação do teste estatístico, foi testada, a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilks) e a equivalência das variâncias (teste de Levene). O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

Todos os cálculos foram realizados com os programas estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Science) versão 11.5.1 (SPSS Inc Chigaco Illinois USA) e Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA – USA).

Resultados

Um animal do grupo L foi perdido durante o experimento. A análise da reprodutibilidade dos dados (histometria e contagem de células) mostrou que estas se encontravam dentro dos limites de concordância (Figura 3).

O resultado da análise histométrica (distância entre a crista óssea e junção cimento esmalte) mostrou que o grupo L apresentou a maior medida ($0,73\pm 0,22\text{mm}$) e a menor medida foi observada no grupo C ($0,29\pm 0,09\text{mm}$) os grupos Dx e Mn apresentaram médias semelhantes ($0,46\pm 0,17\text{mm}$ e $0,49\pm 0,17\text{mm}$ respectivamente), sendo encontradas diferenças significativas ($p<0,001$) entre o grupo L e todos os demais (Figura 4).

A contagem de PMN mostrou-se maior no grupo L ($19,9\pm 4,9\%$) e menor no grupo C ($3,8\pm 3\%$). Os grupos Dx e Mn mostraram $14,0\pm 8,3\%$ e $10,7\pm 5,9\%$ respectivamente, sendo encontradas diferenças significativas ($p<0,05$) entre o grupo C e todos os demais (Figura 5A).

A contagem percentual de MN e F não mostram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos (Figura 5B e 5C).

A contagem de percentual de osteoclastos foi maior no grupo L ($6,4\pm 1,9\%$) e Mn ($5,2\pm 1,6\%$) e menor nos grupos C ($2,7\pm 1,2\%$) e Dx ($3,8\pm 2,2\%$), sendo encontradas diferenças significativas ($p<0,05$) entre o grupo L com os grupos C e Dx, e entre os grupos C e Mn (Figura 5D).

As características histológicas mostraram que os grupos L, Dx e Mn apresentaram epitélio juncional longo com formação de cristas epiteliais e ruptura na porção apical. Infiltrado inflamatório foi observado nas áreas subjacente ao epitélio juncional na maioria dos cortes analisados. No grupo C o epitélio juncional encontra-se intacto com uma conformação normal e um

discreto infiltrado inflamatório subjacente. Em relação ao tecido conjuntivo, foi observada no grupo L, grande quantidade de vasos sanguíneos, sendo possível observar reabsorção do osso alveolar e cemento radicular, caracterizado perda de inserção periodontal e em alguns cortes foram observados seqüestros ósseos. Características semelhantes foram observadas nos grupos Dx e Mn, porém em menor intensidade. O grupo C apresentou características histológicas de normalidade com pequena reabsorção óssea e cementária, o ligamento periodontal encontra-se íntegro em quase toda sua extensão. Presença de placa bacteriana foi observada em vários cortes analisados principalmente nos grupos experimentais. Algumas características histológicas analisadas são apresentadas na Figura 6.

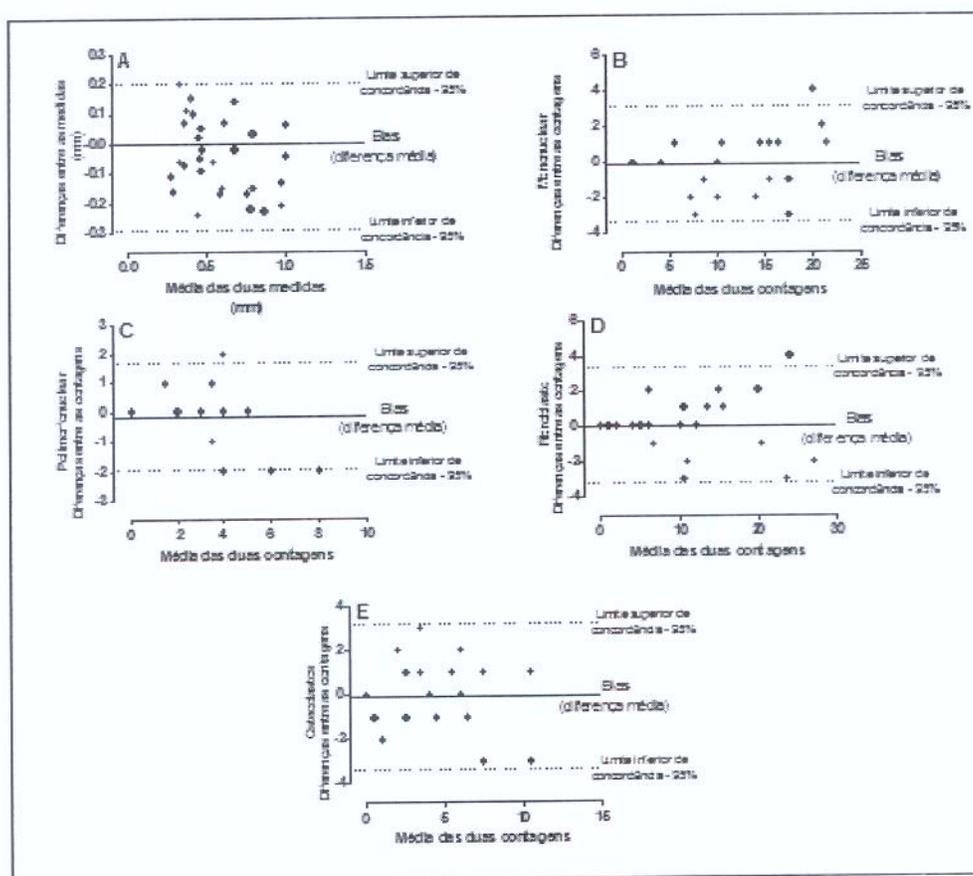


Figura 3- Reprodutibilidade intra-examinador das avaliações após duas análises em momentos distintos. Método de Bland & Altman. (3A) Perda óssea (junção cimento esmalte- crista óssea alveolar; (3B) Contagem de células mononucleares; (3C) Contagem de polimorfonucleares; (3D) Contagem de fibroblastos e (3E) Contagem de osteoclastos. Para reprodutibilidade ficou dentro dos limites de concordância.

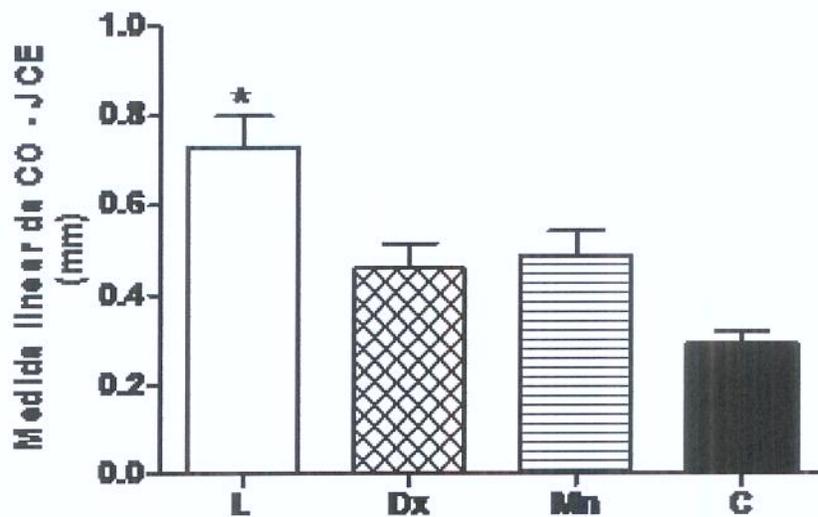


Figura 4- Média e desvio padrão da perda óssea em mm² após os diferentes tratamentos. L- ligadura (controle positivo); Dx- ligadura + doxiciclina; Mn- ligadura + minociclina e C- sem ligadura (controle negativo). Diferenças significativas entre os grupos (p<0,0001-ANOVA). (*) diferenças significativas entre todos os grupos p<0,01 (pós teste Tukey).

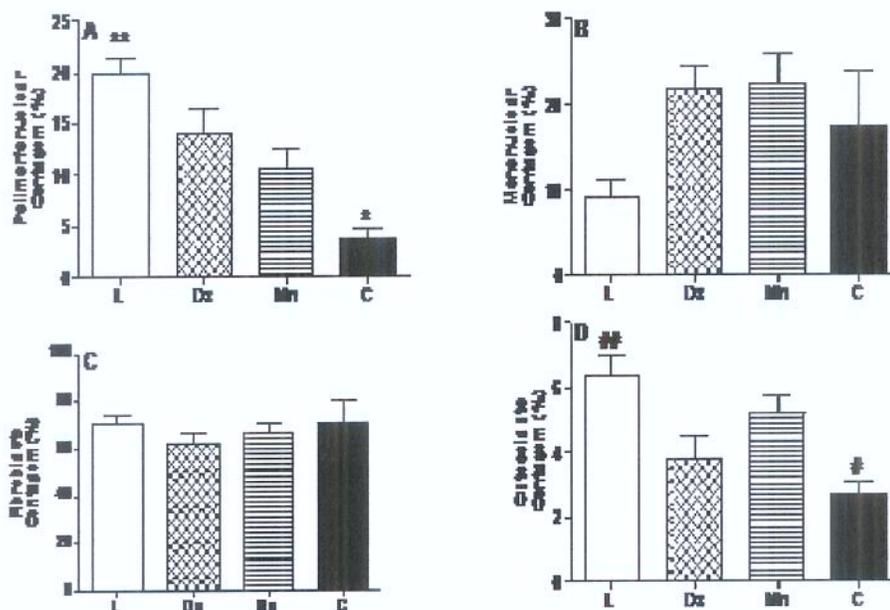


Figura 5- Contagem percentual das células (média e erro padrão) após o período experimental. L – ligadura (controle positivo); Dx- ligadura + doxiciclina; Mn- ligadura + minociclina e C- sem ligadura (controle negativo). (5A)- Polimorfonuclear: (*) p<0,05 com todos os grupos; (**) p<0,01 com Mn. (5B)- Mononuclear: (p=0,0817 –ns). (5C)- Fibroblasto (p=0,6633- ns). (5D) Osteoclasto: (#) p<0,05 com L e Mn; (##) p<0,05 com Dx. Anova and Tukey post hoc test.

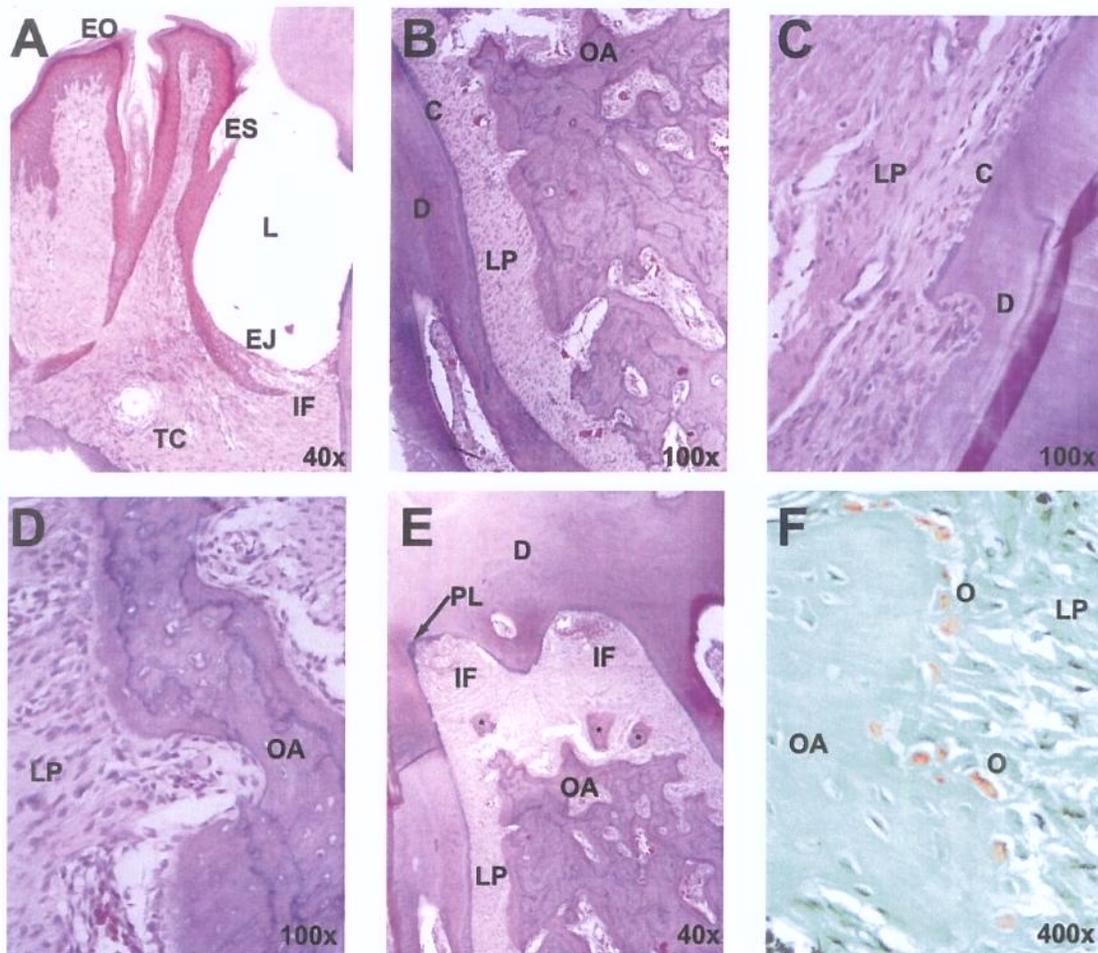


Figura 6- Fotomicrografias ilustrando as características histológicas e histoquímicas observadas. (6A)- Reação tecidual à ligadura (L) observa-se o epitélio oral (EO) e sulcular (ES) integros, no epitélio juncional (EJ) apresenta-se com aumento na sua extensão com ruptura na porção apical, com um infiltrado (IF) subjacente. O tecido conjuntivo (TC) com inúmeros vasos sangüíneos. (6B)- Ligamento periodontal (LP) mostrando a organização das fibras, reabsorção do osso alveolar (OA) na porção mais cervical. (6C)- Reabsorção do cemento radicular (C) e dentina radicular (D). (6D)- Área de reabsorção da crista óssea alveolar (OA). (6E)- Perda de inserção na área de furca, observa-se a presença de placa bacteriana (PL) com infiltrado inflamatório subjacente (IF). A porção cornário do osso alveolar (OA) na região da furca apresenta reabsorção. É possível observar sequestro ósseo (*). (6F)- Coloração histoquímica para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), células TRAP positivas sugerindo osteoclastos (O).

Discussão e Conclusão

A metodologia empregada nessa pesquisa para a indução da doença periodontal (DP) em ratos está bem estabelecida na literatura (Brevik et al 2005, Bezerra et al 2002). O irritante gengival, representado pela ligadura, foi utilizado para que houvesse acúmulo do biofilme bacteriano e conseqüentemente, o desenvolvimento da DP. A opção desta técnica ocorreu pela confiabilidade que apresenta na indução da doença periodontal. Ao contrário de alguns estudos da literatura (Galvão et al 2003, Susin & Rösing 2003), esse trabalho optou por colocar ligaduras nos primeiros molares esquerdo e direito, pois ligadura em apenas um dos lados pode interferir no padrão de mastigação, influenciando a característica da reabsorção óssea (Llavaneras et al 2001, Ramamurthy et al 2002). Segundo Dumitrescu et al. 2004, a colocação de ligaduras em apenas um dos lados faz com que o animal mastigue mais do lado em que a ligadura não foi colocada, provocando assim reabsorção óssea, pela retenção de ração e/ou serragem.

O tratamento convencional da periodontite inclui a remoção mecânica do cálculo e biofilme dental por meio da instrumentação radicular. A resposta do hospedeiro, também deve ser considerada relevante para o resultado final do tratamento, assim sendo, pesquisa têm direcionado para terapias de modulação da resposta do hospedeiro (Ryan & Golub 2000; Llavaneras et al. 2001; Ramamurthy et al. 2002; Buduneli et al. 2004; Dumitrescu 2004; Breivik et al. 2005; Mavragani et al.2005).

A modulação da resposta inflamatória pode ser combinada com a terapia periodontal tradicional, com essa finalidade são utilizadas drogas de uso local ou sistêmico como antiinflamatórios não esteroidais, bisfosfonados e tetraciclinas. (Ryan et al 2000; McCauley et al 2002; Gurgel et al. 2003; Nguyen et al. 2003;

Maitra et al. 2003; Buduneli et al. 2004). As tetraciclina têm mostrado atividade em bloquear MMPs, inibir liberação de citocinas e reduzir reabsorção óssea (Borderie et al. 2001; Ramamurthy et al.2002; Nguyen et al. 2003).

A doxiciclina e minociclina são drogas da classe das tetraciclina, essas substâncias promovem a remoção do cálcio, que é necessário para a ativação das MMPs, bloqueiam a secreção de proteases lisossomiais e modulação da função de osteoclastos. O mecanismo de ação das tetraciclina na modulação da resposta inflamatória parece ser independente de sua ação antimicrobiana (Bezerra et al. 2002; Preshaw et al. 2004).

No presente trabalho foram aplicadas doses subclínicas de doxiciclina e minociclina 24h após a colocação de ligaduras em ratos com o objetivo de avaliar as alterações histológicas, histométricas e histoquímicas. A dosagem de doxiciclina e minociclina utilizada foi de 6mg/Kg, essa foi baseada no trabalho de Ramamurthy et al. 2002, sendo as drogas administradas diariamente por 30 dias.

O resultado da análise histométrica (distância entre a crista óssea e junção cimento esmalte) nas faces mesial e distal mostrou que o grupo L (ligadura + carboximetilcelulose) apresentou a maior medida e a menor medida foi observada no grupo C (Sem ligadura) os grupos Dx (Ligadura + doxiciclina) e Mn (Ligadura + minociclina) apresentaram médias semelhantes, reduzindo a perda óssea quando comparados com o grupo C. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Bezerra et al 2002, Menezes et al 2005, Llavaneras et al 2001, Ramamurthy et al 2002, no entanto, esses autores realizaram a mensuração da perda óssea considerando a junção cimento esmalte à crista óssea e amostras de mandíbulas e maxilas após a remoção do tecido gengival em lupa estereoscópica. Esse método considera as medidas nas faces linguais.

No presente estudo, análise histométrica, foi realizada verificando a perda óssea apenas nas faces proximais. Mesmo assim, apesar da perda óssea encontrada nos estudo citados terem maiores as encontradas nessa pesquisas, foi possível observar que as tetraciclinas tiveram potencial de inibir a reabsorção óssea.

O processo inflamatório observado na doença periodontal, pela presença constante do biofilme bacteriano, caracteriza-se por elementos celulares presentes nos processos agudos e crônicos. Assim sendo é possível observar neutrófilos (PMN), macrófagos, células mononucleares (MN) e fibroblastos (F). Desta forma a reação inflamatória pode ser quantificada pela contagem destes elementos celulares. A contagem percentual de PMN foi maior no grupo L (ligadura + carboximetilcelulose), sendo menor no grupo C. Os grupos tratados com as drogas tiveram o percentual de PMN maior que o controle sem ligadura, porém menor que o grupo L, apesar das diferenças estatísticas terem sido observadas apenas para o grupo tratado com minociclina. Desta forma, pode-se perceber pelos resultados, que as tetraciclinas foram capazes de reduzir o número de PMN e conseqüentemente a resposta inflamatória, bem como a reabsorção óssea. Estudos com diferentes culturas de células têm demonstrado os diferentes mecanismos pelos quais as tetraciclinas poderiam modular a resposta inflamatória, reduzindo a liberação de citocinas e radicais livres (Wang et al 2005, Kirkwood et al 2003).

A contagem percentual de MN não apresentou diferença significativa entre os grupos, isso se deve provavelmente a grande variação encontrada nos dados, no entanto, essa foi menor no grupo L, denotando um processo inflamatório com características aguda, visto que o elemento celular predominante foi o PMN. Nos grupos tratados com doxiciclina e minociclina, foi possível encontrar um percentual maior de MN, caracterizando uma resposta

crônica. No grupo C (sem ligadura) também foi encontrado alto percentual de MN, isso pode ser devido ao fato que roedores também pode apresentar doença periodontal natural e até mesmo devido à presença de fatores irritantes como a serragem que pode ficar impactada entre os dentes gerando assim a resposta inflamatória e conseqüente perda de inserção periodontal (Björnsson et al 2003). Por sua vez, a contagem de F não apresentou diferença significativa entre os grupos, mostrando que os processos regenerativos (tecido gengival) ocorrem de forma simultânea aos inflamatórios. Desta forma, as tetraciclina parecem não interferir com o número de fibroblastos presentes.

O número percentual de osteoclastos, identificados pelo método histoquímico TRAP foi maior para o controle positivo, sendo as diferenças significativas com os grupos tratados com doxiciclina e minociclina, bem como o grupo controle sem ligadura. Esses resultados mostram que os grupos tratados com as tetraciclina, apesar de apresentarem um número percentual de osteoclastos maior em relação a grupo controle sem ligadura, forma capazes de reduzir o número destas células na doença periodontal induzida. Esses resultados estão de acordo com outros relatos na literatura, como os estudos de Kirkwood et al 2003 e Holmes et al. 2004 que mostram que essas drogas promoveram uma inibição da inibição na liberação de citocinas e um efeito pró-apoptótico em osteoclastos.

A análise qualitativa mostrou que o grupo L, Dx e Mn apresentavam ruptura do epitélio juncional na porção apical com um infiltrado inflamatório subjacente. No entanto, essa característica foi mais evidente no grupo L. O grupo C apresentava o epitélio juncional intacto na maioria das amostras analisadas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em outros estudos (Galvão et al 2003, Susin & Rösing 2003, Benatti et al 2003, Brevik et al 2005).

Foi observado reabsorção do osso alveolar e cimento radicular, caracterizando perda de inserção periodontal e em alguns cortes foram observados seqüestros ósseos. Características semelhantes foram observadas nos grupos Dx e Mn, porém em menor intensidade. O grupo C apresentou características histológicas de normalidade com pequena reabsorção óssea e cementária, o ligamento periodontal encontra-se íntegro em quase toda sua extensão. Características histológicas semelhantes foram observadas em outros estudos com metodologia semelhante (Dumitrescu et al 2004. Galvão et al 2003. Gurgel et al 2004).

Dentro dos limites da presente pesquisa, pode-se concluir que tanto a doxiciclina quanto a minociclina apresentam potencial de reduzir a resposta inflamatória e conseqüente reabsorção óssea na doença periodontal induzida em ratos, porém novos estudos são necessários para estabelecer por quais vias essas drogas podem reduzir o processo inflamatório e a reabsorção óssea na doença periodontal induzida por ligaduras em ratos.

Referências Bibliográficas

1. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini, Karimbux N. **Membrane type (MT) 1- matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat.** J Periodontol, v.74, n.4, p.494-500, Apr. 2003.
2. American Academic of Periodontology. **Modulation of the host response in periodontal therapy.** J Periodontol, v.73, n.4, p.460-470, April. 2002.
3. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Nociti Jr. FH. **Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. Na in vivo study in rats.** J Periodont Res, v.38, n.3, p.351-353, Jun. 2003.
4. Bezerra MM, Brito GAG, Ribeiro RA, Rocha FAC. **Low dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats.** Braz J Med Biol Res, v.35, n.5, p.613-616, May. 2002.
5. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. **The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats.** J Periodontal Res. n.38, v.6, p.543-550, Dec. 2003.
6. Bland JM, Altman DG. **Measuring agreement in method comparison studies.** Stat Methods Med Res.;v.8, v.2, p.135-160, Jun. 1999.
7. Borderie D, Hernvann A, Hilliquin P, Lemarchal H, Kahan A, Ekindjan OG. **Tetracyclines inhibit nitrosothiol production by cytokine-stimulated osteoarthritic synovial cells.** Inflamm Res, v.50, n.8, p.409-414, Aug. 2001.
8. Breivik T, Gundersen Y, Fonnum F, Vaagenes, Opstad PK. **Chronic glycine treatment inhibits ligature-induced periodontal diseases in wistar rats.** J Periodont Res, v.40, n.1, p.43-47, Feb. 2005.

9. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Türkoglu O, Baskesen A, Atilla G. **Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats.** J Periodontol, v.75, n.11, p.1516-1523, Nov. 2004.
10. Dumitrescu AL, Abd EL-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. **A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation.** J Clin Periodontol, v.31, n.8, p.596-604, Aug. 2004.
11. Galvão MPA, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. **Methodological considerations on descriptive studies of induce periodontal diseases in rats.** Pesq Odontol Bras, v.17, n.1, p.56-62, Jan-Mar. 2003.
12. Gurgel BCV, Duarte PM, Nociti Jr. FH, Sallum EA, Casati MZ, Sallum AW, Toledo S. **Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats.** J Periodontol, v.75, n.12, p.1613-1618, Dec. 2004.
13. Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ, Grabowski PS. **Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors.** Bone, v.35, n.2, p.471-478, Aug. 2004.
14. Khodr B, Khalil Z. **Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair.** Free Radic Biol Med, v.30, n.1, p.1-8, Jan1. 2001.
15. Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. **Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability.** Biochem Pharmacol, v.66, n.9, p.1809-1819, Nov1. 2003.

16. Llaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, Ryan ME, Golub LM, Sorsa T. **A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats.** J Periodontol, v.72, n.8, p.1069-1077, Aug. 2001.
17. Maitra SR, Bhaduri S, Valane PD, Tervahartiala T, Sorsa T, Ramamurthy N. **Inhibition of matrix metalloproteinases by chemically modified tetracyclines in sepsis.** Shock, v.20, n.3, p.280-285. Sep. 2003.
18. Maitra SR, Shapiro MJ, Bhaduri S, El-Maghrabi R. **Effect of chemically modified tetracycline on transforming growth factor- β 1 and caspase-3 activation in liver of septic rats.** Crit Care Med, v.33, n.7, p.1577-1581, Jul. 2005.
19. Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. **Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats.** Eur J Orthod, v.27, n.3, p.215-225, Jun. 2005.
20. McCauley LK, Nohutcu RM. **Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: Principles and implications for diagnosis and therapy.** J Periodontol, v.73, n.11, p.1377-1391, Nov. 2002.
21. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Walker C, Bradshaw MH. **Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review.** J Clin Periodontol, v.31, n.9, p.697-707, Sep. 2004.
22. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu J-W, Liu Y, Turner G, Golub LM, Vernillo AT. **Inhibition of matrix metalloproteinase mediated periodontal bone loss in rats: A comparison of 6 chemically modified tetracyclines.** J Periodontol, v.73, n.7, p.726-734, Jul. 2002.



23. Ryan ME, Golub LM. **Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy.** Periodontol 2000, v.24, p.226-238, Oct. 2000.
24. Saikali Z, Singh G. **Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis.** Anticancer Drugs, v.14, n.10, p.773-778, Nov. 2003.
25. Salvi GE, Lang NP. **Host response modulation in the management of periodontal diseases.** J Clin Periodontol, v.32, Suppl.6, p.108-129, 2005.
26. Susin C, Rösing CK. **Effect of variable moderate chronic stress on ligadure-induced periodontal disease in wistar rats.** Acta Odontol Scand, v. 61, n.5, p.273-277, Oct. 2003.
27. Wang, AI, Yu ACH, Lau LT, Lee C, Wu Le M, Zhu XA, Tso MOM. **Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation.** Neurochem Int, v.47, n.1-2, p.152-158, Jul. 2005.

