

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GERIATRIA

**RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E MASSA ÓSSEA
SISTÊMICA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

FLÁVIO DE LECUE PILLON

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Araújo de Souza

Tese de Doutorado

Porto Alegre / RS

2006

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Antonio Carlos Araújo de Souza, agradeço pelo apreço, criatividade, curiosidade, conhecimento e bom humor, atributos característicos de sua identidade profissional e humana.

À Profa. Dalva Maria Pereira Padilha, minha co-orientadora e meu exemplo de como um(a) orientador(a) pode vir a ser, sem tirar nem pôr.

Ao Cassiano Rösing (suprimi propositalmente o Prof.), Ana Soletti e Eduardo (colocação das ligaduras), Raquel (IPB), Patrícia (FEEPS), Emilene (densitometria óssea), Dênis Barbieri e Maurício Barbieri (análise das imagens no computador), e Mário Wagner (estatística), assim destacados entre outros de igual importância, pelo auxílio imprescindível na condução dos trabalhos experimentais desta tese.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina/Ciências da Saúde da PUCRS, especialmente aos do Instituto de Geriatria e Gerontologia, pela consideração, atenção, e pelo conhecimento dividido comigo e com meus colegas. À Sônia, ao Maurício e à Mônica (Secretarias do Pós-Medicina e IGG) pela paciência e presteza.

À Flor, que acompanhou os angustiantes momentos decisivos para a conclusão deste trabalho, assim como acompanha as demais coisas da minha vida, e que tanta alegria e amor me traz.

Aos meus pais, exemplos de força e determinação, de amor e carinho. Não dá para esquecer (afinal meu doutorado foi em Geriatria) que, neles, tenho meus grandes exemplos do que vem a ser, realmente, um “envelhecimento bem-sucedido”.

À Clarice e ao Elias, é bom lembrar que “é de pequenino que se torce o pepino” (dêem “geriatria preventiva” em doses diárias, físico e emocionalmente, ao Antônio Pedro desde já – vocês sabem como -).

Aos meus colegas professores da Odontologia da ULBRA por terem ouvidos.

A Deus, por me ajudar a andar sempre pra frente, e por clarear meu caminho.

A todos vocês, meu muito obrigado.

RESUMO

A ocorrência de alterações inflamatórias crônicas no organismo humano vem sendo relacionada a desfechos patológicos de ordem complexa, resultando em eventos responsáveis pela abreviação da longevidade ou diminuição da qualidade de vida em indivíduos idosos. O objetivo do presente estudo foi analisar a relação existente entre a atividade de periodontite e alterações na massa óssea sistêmica, após indução de doença periodontal em ratos. A avaliação da massa óssea sistêmica foi determinada através do emprego de raio-x de dupla energia (densitometria óssea), bem como análise do conteúdo trabecular das tíbias dos animais experimentais. Doença periodontal foi induzida através da colocação de ligaduras de fio de seda envolvendo o segundo molar superior esquerdo de cada animal do grupo teste (n=14). Os animais do grupo controle não receberam ligaduras. Após 30 e 60 dias da indução de periodontite, a análise por densitometria óssea não revelou diferenças significativas na densidade mineral óssea e no conteúdo mineral ósseo entre os grupos teste e controle. No entanto, o parâmetro área de tecido ósseo apresentou-se, aos 30 dias, maior nos animais do grupo teste do que nos animais do grupo controle. Aos 60 dias, no entanto, esta relação se inverteu, sendo a área de tecido ósseo significativamente maior no grupo controle. A comparação intergrupos do conteúdo mineral ósseo (BMC) entre os períodos 30 e 60 dias mostrou ter o grupo controle apresentado um contínuo crescimento ósseo, enquanto o grupo teste apresentou um acréscimo significativamente menor nos valores relativos ao BMC. Em exame histomorfométrico, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com relação ao percentual de preenchimento trabecular do osso medular nas tíbias analisadas. Os animais do grupo controle apresentaram maior preenchimento ósseo

trabecular do que os do grupo teste. De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que a atividade de periodontite esteve relacionada com uma diminuição no padrão de crescimento ósseo sistêmico normal em ratos Wistar, porém não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a estrutura óssea trabecular das tíbias nos animais do grupo teste.

Palavras-chave: Periodontite, osteoporose, densitometria, massa óssea, rato.

ABSTRACT

The occurrence of chronic inflammation in humans has been related to complex pathological outcomes, resulting in events that are responsible for abbreviations of life and life quality in elderly persons. The present study aimed at verifying the relationship between periodontitis and systemic bone mass alterations, after induction of periodontal disease in male Wistar rats. Systemic bone mass was determined by bone densitometry (double energy X-ray), and tibia trabecular bone analysis. Periodontal disease was induced with the placement of silk ligatures around the maxillary left second molar of each animal of the test group (n=14). The control group did not receive ligatures. After 30 and 60 days of ligature placement, the bone densitometry analysis did not reveal statistically significant differences between groups both for bone mineral density and bone mineral content. However, the total bone area was, at 30 days, higher in the test group than in controls. At 60 days, this relationship was inverted, with a higher bone area in the control group. The control group presented a progressive bone growth, as shown by the comparison of the bone mineral content (BMC) between 30 and 60 days, significantly higher when compared to the test group. Histomorphometrically, there was no statistically significant difference between groups regarding the relative filling with trabecular bone of the marrow area at the tibia. The control group had more trabecular filling than the test group. According to the results of the present study, it can be concluded that the activity of periodontitis was related to a lower pattern of systemic bone growth in Wistar rats, but did not provoke a statistically significant effect on bone trabecular structure in test animals.

Key words: Periodontitis, osteoporosis, densitometry, bone mass, rat.

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	pg. 8
2. Objetivos	pg. 18
3. Materiais e Métodos	pg. 19
4. Resultados	pg. 26
5. Discussão	pg. 35
6. Conclusões	pg. 43
7. Referências Bibliográficas	pg. 44
8. Anexos	pg. 50

1. REVISÃO DE LITERATURA

O entendimento do processo de envelhecimento como uma ocorrência natural do ciclo de vida é fundamental na compreensão do seu impacto sobre as condições de saúde associadas à longevidade e qualidade de vida dos seres humanos. Por não ser considerado uma doença, mas um evento contínuo e inevitável, com características específicas e alterações cumulativas, as condutas clínicas direcionadas ao manejo do processo de envelhecimento não podem imbuir-se do intuito de anulá-lo. No entanto, face à existência das doenças crônico-degenerativas associadas ao envelhecimento, o mesmo pôde ser classificado como usual quando ocorre em associação com tais moléstias ou disfunções, comprometedoras do desfrute salutar ou pleno da integridade de faculdades mentais e físicas de indivíduos em idade avançada. O chamado envelhecimento normal, paradoxalmente menos prevalente, está relacionado à seqüência de eventos de ordem biológica tidos como habituais à natureza humana. Torna-se lógica a conclusão, frente a esta ótica, de que toda e qualquer intervenção nos parâmetros relacionados ao processo de envelhecimento usual devem assumir o objetivo de transformá-lo, sempre de maneira ética e inevitavelmente interdisciplinar. Para tal, torna-se indispensável a incorporação de aspectos diferenciais importantes para uma correta ordenação e condução de uma prática clínica baseada em evidências científicas que configure-se como um conjunto de atuações profissionais voltadas à manutenção das características orgânicas associadas, em literatura pertinente e séria, ao processo de envelhecimento normal, com vistas à inserção dos indivíduos idosos em programas de promoção de saúde de resultados previsíveis e eficazes.

A ocorrência de alterações inflamatórias crônicas no organismo humano vem sendo relacionada a desfechos patológicos de ordem complexa, resultando em eventos responsáveis pela abreviação da longevidade ou diminuição da qualidade de vida em indivíduos idosos. As citocinas inflamatórias são proteínas ativas de baixo peso molecular que possuem funções endócrinas e metabólicas, além de serem reconhecidas como produtos da interação celular frente à atuação do sistema imune e do processo inflamatório estabelecido. Algumas destas proteínas foram identificadas como fatores de risco independentes para o desenvolvimento de doenças obstrutivas coronarianas e cerebrovasculares (Theuma & Fonseca, 2003; Svenungsson et al., 2003). A produção exacerbada de citocinas, quando na presença de doenças de natureza inflamatória crônica, esteve associada a alterações orgânicas potencialmente intervenientes nas condições que envolvem resistência à insulina, disfunção endotelial, estágios iniciais de processos ateroscleróticos e eventos relacionados à diminuição sistêmica da massa óssea, entre outras (Taylor et al., 1996; Savickiene & Baranauskaite, 2002; Lane & Rehman, 2002; Aldhani & Hamdy, 2003; Kuvin & Karas, 2003). Mediadores químicos inflamatórios como IL-6, IL-11 e TNF estão relacionados à resposta orgânica na fase aguda de inflamação tecidual quando injúrias traumáticas ou processos infecciosos acometem o organismo humano. Segundo Heinrich et al. (2003), alterações na regulação de produção e atividade desses mediadores químicos contribuem para o estabelecimento, progressão e manutenção do estado inflamatório presente em doenças como artrite reumatóide, doença inflamatória de Crown e retocolite inflamatória, e osteoporose. A expressão de altos níveis de IL-6 em ratos foi observada em diversas doenças (incluindo artrite reumatóide, artrite crônica juvenil de caráter sistêmico e osteoporose)(Ishihara & Hirano, 2002).

A manutenção do estado crônico de processos inflamatórios no organismo foi cientificamente comprovado como parcialmente responsável pelo desenvolvimento de uma série de doenças crônico-degenerativas. Existem, na literatura, evidências suficientes para comprovar o papel das doenças inflamatórias crônicas como fatores modificadores ou predisponentes de processos patológicos crônico-degenerativos significativamente associados às moléstias mais prevalentes no processo de envelhecimento usual.

De acordo com Tracy (2003), as evidências científicas produzidas nos dez últimos anos tornaram clara a relação de doença cardiovascular e aterosclerose com componentes “microinflamatórios”, e sua associação com níveis baixos ou intermediários de marcadores do processo inflamatório, como a proteína C-reativa. Ainda conforme o mesmo autor, inflamação crônica está diretamente associada a diversas (senão a todas) doenças crônicas relacionadas à idade avançada. Conseqüentemente, a existência de atividade de doenças inflamatórias crônicas capazes de elevar os níveis de tais mediadores químicos representam um risco potencial de modificação no padrão do processo de envelhecimento humano.

A Periodontia Médica, área de conhecimento específico que se destina ao estudo das possíveis influências das patologias periodontais sobre a saúde geral dos indivíduos acometidos, acaba por configurar-se como expressiva representante de uma nova mudança de paradigma. Desta forma, estabelece através da evidência científica disponível, a associação entre saúde/doença periodontal e saúde/doença sistêmica, determinando um eixo bidirecional no qual a doença periodontal pode influenciar negativamente a saúde geral de um indivíduo assim como diversas patologias gerais podem afetar tanto o estabelecimento como a progressão das doenças periodontais. Segundo Offenbacher (1996), a presença de um infiltrado inflamatório significativo no tecido conjuntivo gengival determina hiperatividade de neutrófilos (estimulada pela presença de citocinas pró-inflamatórias no

sítio infectado), danos teciduais diretos ocorrem por atuação de lipopolissacárides oriundos da presença das bactérias responsáveis pela infecção, bem como danos indiretos em função da presença de marcadores bioquímicos de inflamação determinando perdas de tecido ósseo (atividade de prostaglandinas e de fator de necrose tumoral) e de tecido conjuntivo do ligamento periodontal (atividade de colagenase). Como repercussão clínica destes eventos histopatológicos, teremos presença de exsudatos inflamatórios (sangramento e/ou supuração) clinicamente mensuráveis por sondagem periodontal, presença de ulceração do epitélio protetor do crevículo periodontal, e reabsorção de tecido ósseo dos processos alveolares da maxila e da mandíbula. Estas alterações possuiriam o potencial de promover, em diferentes órgãos ou sistemas, alterações oriundas da presença de um processo infecto-inflamatório de tal magnitude.

Associações entre a doença periodontal inflamatória e alterações locais e generalizadas no metabolismo ósseo também foram investigadas na literatura. A possível interferência de alterações envolvendo osteoporose e a progressão das perdas ósseas associadas à periodontite foi relatada. Em estudo clínico conduzido por Bullon et al. (2005), 73 mulheres pós-menopáusicas submeteram-se a exame dos níveis de osteocalcina (um marcador sistêmico de ativação de formação óssea) no soro, saliva e no fluido gengival. Adicionalmente, foi realizada densitometria óssea de vértebra e exame periodontal composto por profundidade de sondagem (PS) e níveis de inserção clínica (NIC). Não foram observadas diferenças significativas entre PS e NIC comparados com os níveis de osteocalcina examinados, e tampouco entre os pacientes classificados como apresentando ou não periodontite e estes níveis na saliva e no soro. Entretanto, os níveis de osteocalcina no fluido gengival foram significativamente maiores no grupo de mulheres com

periodontite, além de estarem significativamente correlacionados com maiores PS. Os autores concluíram que os níveis de osteocalcina no fluido gengival correlacionam-se com o *status* periodontal, mas não com o *status* de osteoporose.

Tezal et al.(2000) investigaram a relação entre a densidade mineral óssea (DMO) sistêmica e a doença periodontal em um estudo com a participação de 70 mulheres pós-menopáusicas (média de 62 anos de idade), onde a densidade mineral óssea (DMO) foi acessada por densitometria óssea do trocanter e intertrocanter, triângulo de Ward e regiões totais do fêmur, além da coluna lombar, e a doença periodontal acessada através de exames de níveis de inserção clínica, perda alveolar interproximal (PAI), profundidade de sondagem, e parâmetros supragengivais (índices de placa e gengival, e quantidade de cálculo dental), realizados por profissionais calibrados. A análise por regressão linear múltipla ajustada para idade, idade na menopausa, suplementação com estrógeno, fumo e índice de massa corporal revelou correlações significativamente positivas entre PAI e DMO do trocanter, triângulo de Ward e regiões totais do fêmur. NIC esteve correlacionado consistentemente com DMO em todas as regiões investigadas, apesar de não atingir significância estatística. Os autores concluíram ser a osteopenia pós-menopáusicas um indicador de risco à periodontite, mas sem mencionar a possibilidade inversa, em estudo onde a relação causal entre os fatores estudados não pôde ser avaliada.

Em estudo de Takaishi et al. (2005), DMO alveolar e da coluna lombar estiveram significativamente correlacionados entre si e com ultrassonografia quantitativa do calcâneo, em 40 mulheres pós-menopáusicas de 50 a 69 anos. Adicionalmente, DMO alveolar demonstrou correlação com achados clínicos periodontais, como PS. Há de ser considerado, no entanto, que estes valores, associados às condições de osteopenia e periodontite,

apresentam tendências de serem naturalmente maiores com o passar da idade, por progressões cumulativas de doença e diminuição hormonal. Assim, concluir que estas doenças se relacionam etiopatogenicamente em estudos desta natureza seria precipitado, pois poderá haver uma relação independente entre si em sua progressão, mas dependente dos processos associados ao envelhecimento biológico.

Segundo Taguchi (2003), a série de estudos clínicos disponíveis na literatura apresentam resultados diversos na relação das densidades minerais ósseas do esqueleto completo e dos processos alveolares. Causas para estas discrepâncias podem estar nas regiões dos processos alveolares mensuradas (grandes diferenças de massa óssea entre as mesmas, não associadas com o estado osteoporótico) e tamanho das amostras dos estudos. Segundo o autor, investigações adicionais em largas populações são necessárias para esclarecer a relação entre a massa óssea bucal e sistêmica. Wactawski-Wende (2001), em um estudo de revisão sobre a relação entre a doença periodontal e a osteoporose relata que, ao analisar a qualidade científica dos estudos que a investigaram, em sua maioria tiveram resultados comprometidos por tamanhos pequenos de amostra, controle limitado de outros fatores confundentes em potencial, e definições muito variadas do que seria entendido como presença de periodontite e osteoporose. Além disso, há escassez de estudos prospectivos, onde a temporalidade da associação poderia ser estabelecida. Questões como o quanto a perda de osso alveolar (localizada) está relacionada a perdas ósseas generalizadas (sistêmicas), por exemplo, permanecem necessitando de evidência adicional (Genco & Grossi, 1998).

A observância da eventual interferência da atividade de doenças inflamatórias crônicas na densidade ou massa óssea tem sido uma preocupação relevante na literatura

pertinente, partindo-se do pressuposto biológico de que muito embora a massa óssea seja primariamente determinada geneticamente, a existência de fatores exógenos pode desempenhar um papel determinante na sua modificação. De acordo com Cimaz (2002), doenças inflamatórias crônicas podem apresentar efeitos sobre a massa óssea através de diversos mecanismos. Na presença de doenças inflamatórias crônicas, a homeostase no processo de formação/reabsorção óssea é alterada, resultando freqüentemente em decréscimo na massa e densidade óssea. Dentre os fatores que poderiam contribuir para a osteopenia que acompanha tais doenças crônicas, a presença de citocinas inflamatórias tem-se apresentado, atualmente, como objeto de especial interesse científico. Em conjunção com a desnutrição, desordens nos eixos neuroendócrinos, imobilização e uso prolongado de glicocorticóides, tais alterações celulares podem influenciar na atividade de células ósseas, além de provavelmente regular seu ciclo de vida através de mecanismos apoptóticos (Daci, Van Cromphaut & Bouillon, 2002).

Citocinas são elementos importantes na ocorrência de desordens no remodelamento ósseo. Em estudo de Jilka et al. (1992), o aumento no processo de reabsorção óssea em ratas ovariectomizadas pôde ser corrigido através da administração de anticorpos neutralizantes para interleucina-6. Segundo esses autores, a mesma anormalidade no metabolismo ósseo pode ser revertida através de tratamento com estrogênio. Na presença de deficiência de estrogênio, há uma tendência à produção aumentada de interleucinas-1 e 6 por células do osso medular, levando a um aumento na atividade osteoclástica. Adicionalmente, a ação das interleucinas-1 e 6 pode apresentar efeitos sinérgicos no aumento da reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos (Kurihara et al., 1990). De acordo com Pfeilschifter et al. (1989) e Thomson, Saklatvala e Chambers (1986), a interleucina-1

afeta células de todos os estágios na linhagem de osteoclastos, e promove efeitos adicionais sobre a osteoclase por estimular a síntese de prostaglandinas (Boyce et al., 1989). A influência exercida pela interleucina-1 neste processo pode ocorrer tanto por ordem local como sistêmica. Infusões de interleucina-1 induziram aumento no processo de reabsorção óssea por osteoclastos em pontos distantes do local de infusão (Boyce et al., 1989).

As interleucinas apresentam, também, efeitos sobre os osteoblastos, inibindo a formação óssea quando continuamente administrada e levando a estágios intermitentes de proliferação de células ósseas, que se diferenciam formando osteoblastos (Boyce et al., 1989). A interleucina-6 é uma citocina gerada no próprio tecido ósseo, em resposta a hormônios (como o paratormônio) e a outras citocinas (como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral) (Feyen et al., 1989), mas a produção de interleucina-6 parece ser mais responsiva aos estímulos oriundos de citocinas do que de hormônios, além de potencializar o efeito destes na reabsorção óssea, fato comprovado *in vitro* e *in vivo* (Gilles et al., 1994). O fator de necrose tumoral, produzido por células envolvidas no processo imunitário de defesa, apresenta efeito sobre o metabolismo ósseo através do estímulo em todas as linhagens de osteoclastos, de uma forma semelhante à da ação da interleucina-1 (Smith, Gowen & Mundy, 1989).

As prostaglandinas, oriundas do metabolismo do ácido aracdônico durante um processo inflamatório instalado, apresentam ação característica sobre células ósseas de maneira ainda não completamente esclarecida. Em culturas de osteoclastos isolados, prostaglandinas causam a contração dos mesmos, o que usualmente está associado a uma atividade reabsortiva diminuída em tecido ósseo (Chambers & Ali, 1983). No entanto, há possibilidade de que as prostaglandinas consigam mediar reabsorção óssea estimuladas por

fatores sistêmicos como a presença de interleucina-1 e fator de crescimento transformador-alfa. Em estudo de Boyce et al. (1989), a injeção direta de interleucina-1 no tecido subcutâneo sobre a calvária de ratos normais aumentou marcadamente a ocorrência de reabsorção óssea realizada por osteoclastos localmente, efeito este que pode, parcialmente, ser inibido através de tratamento dos ratos com indometacina, que inibe a síntese de prostaglandinas.

De acordo com Pfeilschifter et al. (1985), estudos estabeleceram associações entre perdas generalizadas de trabeculado ósseo em ratos após a indução de processos inflamatórios por um período de 3 semanas. Segundo os mesmos autores, osteopenia induzida por uma única lesão inflamatória de suficiente expressividade permaneceu aparente mesmo após 14 dias do início da indução, demonstrando que efeitos similares no tecido ósseo podem ocorrer em processos inflamatórios de menor severidade, mas de característica crônica mais prolongada. Tal evidência biológica endereça esta questão à ocorrência de alterações inflamatórias crônicas de expressão no organismo.

Tradicionalmente, o risco do estabelecimento de osteoporose generalizada esteve relacionado com os níveis de atividade inflamatória no organismo. Segundo Ringe (1996), a presença de mediadores químicos inflamatórios oriundos de articulações afetadas por doenças crônicas pode influenciar nas características do metabolismo ósseo, determinando atividade osteoclástica potencializada. Assim, em fase inicial de artrite reumatóide, por exemplo, a melhor prevenção para a osteoporose seria a adequada supressão da inflamação.

De acordo com Lerner (1994), à semelhança do que se observa na presença de artrite reumatóide e osteomielite, a periodontite determina a instalação de processos de resposta tecidual capazes de provocar atividade osteoclástica através da produção de citocinas e

mediadores químicos inflamatórios como interleucinas e fator de necrose tumoral. Minne et al. (1984) desenvolveram um modelo de determinação de osteopenia em ratos através da indução de processos inflamatórios, tendo observado perda generalizada de tecido ósseo trabeculado após a injeção de irritantes inespecíficos. Segundo os autores, a identificação e caracterização deste mecanismo inflamatório instigam a suspeita de que doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide e a doença periodontal possam levar ao estabelecimento ou a complicações adicionais em quadros característicos de perda patológica de massa óssea.

Dentre os preceitos básicos da ciência e da clínica em medicina e odontologia, é inquestionável a importância que a prática baseada em evidências científicas exerce nas condutas terapêuticas na contemporaneidade. Considerando a produção científica na atualidade, é reconhecido o fato de múltiplos aspectos ambientais, comportamentais e patológicos adquiridos encontrarem-se envolvidos no desenvolvimento das doenças mais significativamente associadas ao processo de envelhecimento usual, em conjunção com as características genéticas determinantes de suscetibilidades específicas para estas doenças em questão. Assim, é fundamental o esforço da comunidade científica na detecção de elementos potencialmente intervenientes na ocorrência de tais doenças. A realização de investigações em pesquisa básica e aplicada alicerçadas nesta premissa torna-se, portanto, de extrema relevância, no intuito de favorecer a identificação de fatores de risco em potencial, assim contribuindo para que as atuações de caráter preventivo prevaleçam de forma consistente na manutenção de saúde da coletividade.

2. OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Verificar se a manutenção do estado inflamatório oriundo da indução de periodontite em ratos do tipo Wistar seria capaz de promover alterações significativas na massa óssea sistêmica destes animais, em comparação com ratos sem periodontite.

Objetivos Secundários:

- Verificar alterações nos parâmetros conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e área óssea, observadas através de raio-x de dupla energia (densitometria óssea), 30 e 60 dias após a indução de periodontite nos animais experimentais do grupo teste, em comparação com animais sem periodontite;
- Verificar alterações no grau de preenchimento ósseo trabecular nas tíbias dos animais experimentais, 30 e 60 dias após a indução de periodontite, através de análise histomorfométrica;
- Verificar se existe influência da periodontite instalada por 30 ou 60 dias sobre o padrão de crescimento contínuo do esqueleto dos animais teste, em comparação aos do grupo controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo dos animais para o experimento:

Após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS, foi feita solicitação dos animais experimentais ao Biotério da Coordenação de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, onde os mesmos foram criados e mantidos até o final do período experimental. Foram selecionados 28 ratos Wistar machos. Previamente ao início do estudo, os animais foram mantidos sob condições convencionais no Biotério por 60 dias para atingir idade e peso ideais para o experimento. Esse fato permitiu adaptação ao ambiente e à manipulação do pesquisador.

Os animais ficaram sob condições de ciclos claro/escuro de 12 horas e receberam ração padronizada e água *ad libitum*, e apresentavam, ao momento da colocação das ligaduras para indução da periodontite, 6 meses de idade. O peso corporal foi analisado em ambos os grupos no momento da colocação das ligaduras (*baseline*) e ao final dos períodos experimentais (30 ou 60 dias após a colocação das ligaduras). A avaliação do peso dos animais teste e controle foi importante para a análise comparativa deste parâmetro com os valores apresentados na densitometria óssea, bem como para permitir a comparação do padrão de desenvolvimento e crescimento corporal entre os grupos. A observação comparativa do peso dos animais ao final do experimento também permite confirmar a inexistência de disparidades na alimentação dos animais após terem, no grupo teste, periodontite instalada.

Fase Experimental:

Doença periodontal foi induzida através da colocação de ligaduras de fio de seda trançado de espessura 4-0 (Johnson & Johnson) envolvendo o segundo molar superior esquerdo, com um nó na face lingual do mesmo (Sallay et al., 1982; Susin, 1999). Os ratos foram divididos randomicamente em dois grupos. Cada animal do grupo teste (n=14) recebeu uma ligadura. Os animais do grupo controle (n=14) não tiveram periodontite induzida, mas passaram pelos momentos de captura, apreensão e anestesia de forma semelhante aos do grupo teste. Os procedimentos foram realizados sob anestesia geral, via intra-muscular. O pesquisador realizou treinamentos prévios para anestésiar os animais e para adaptação ao manejo e colocação conveniente das ligaduras. Para anestesia, foi utilizada uma solução composta por um fármaco dissociativo (Cloridrato de Quetamina 100mg/kg - Dopalen^R) associado a um fármaco miorrelaxante (Cloridrato de Xilasina 50mg/kg - Anascedan^R).

As verificações do posicionamento das ligaduras revelaram não ter havido deslocamento nem perda das mesmas em nenhum animal durante o estudo. Tendo passado 30 dias da colocação das ligaduras foi realizada a eutanásia de 7 animais randomicamente selecionados do grupo teste, e 7 do grupo controle, através de deslocamento cervical. Após o término do período de 60 dias de periodontie induzida foi realizada a eutanásia dos demais animais (7 do grupo teste e 7 do grupo controle). A maxila e uma tíbia de cada animal experimental foram excisadas e fixadas em solução de formalina tamponada (pH 7,3).

Análise histológica e comprovação da efetividade do método de indução de Periodontite:

Foram realizados cortes histológicos méso-distais envolvendo as estruturas periodontais dos dentes com periodontite dos animais teste (n=7), bem como em dentes equivalentes dos animais controle (n=7) 30 dias após a colocação das ligaduras no grupo teste, permitindo análise descritiva por microscopia ótica em cortes descalcificados das modificações morfológicas das cristas alveolares mesiais, distais e inter-radiculares. Estas observações serviram ao propósito de confirmar a efetividade do método de indução de periodontite. As maxilas dos animais teste e controle foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Foram, então, seccionadas e cada parte submetida à descalcificação em solução de Ana Morse por 14 dias. As peças descalcificadas foram desidratadas em série alcoólica de concentração crescente, embebidas em parafina, para então serem emblocadas.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, em secções de 4 μ m e aderidos em lâminas para microscopia. De cada bloco de parafina foram preparadas 3 lâminas. Os cortes foram corados pela técnica de rotina (hematoxilina/eosina). Cada lâmina corada foi examinada em microscópio óptico AX 70 Olympus.

Avaliação dos resultados:

Densitometria óssea:

Foram realizadas mensurações da massa óssea sistêmica nos animais dos grupos teste (n=7) e controle (n=7) ao término do período experimental (30 dias), sendo esta última medição realizada previamente à análise histológica. Foi empregado método de incidência radiográfica de dupla energia para densitometria óssea, previamente validado para o animal em estudo através de análise de concordância e reprodutibilidade, testadas através da realização de 10 testes seqüenciais com reposicionamento do mesmo animal, com a posição padrão para a realização dos demais exames. A média, desvio-padrão e coeficiente de variação para os 10 valores de BMC foram calculados.

Para a análise densitométrica dos animais experimentais, os mesmos foram posicionados no densitômetro de forma padronizada, de tal maneira a não haver sobreposição de partes corpóreas, permitindo a inclusão de todo o corpo (inclusive a cauda) na área de medição do aparelho. Os valores relativos à medição da densidade óssea gerados pelo densitômetro foram analisados para permitir o cálculo de médias dos mesmos (Anexo 1). Tendo passado 2 meses da colocação das ligaduras para indução de periodontite nos animais do grupo teste, os animais que não foram sacrificados para a análise por histologia e densitometria em 30 dias foram submetidos a análise de massa óssea por densitometria (n=7 para o grupo teste e n=7 para o grupo controle), para avaliação longitudinal da relação entre o tempo de manutenção do estado inflamatório crônico de ordem local e as alterações cumulativas na massa óssea sistêmica. Para tanto foram realizados, nos animais sacrificados aos 60 dias, os

mesmos passos previamente descritos para avaliação de massa óssea sistêmica através de densitometria óssea.

Análise da área trabecular de cortes sagitais em tíbias:

Foi realizada análise histológica das tíbias dos grupos teste e placebo com 60 dias de processo inflamatório periodontal instalado, com o intuito de verificar a existência de alterações diferenciais no trabeculado ósseo, entre os grupos.

As tíbias esquerdas dos animais experimentais foram dissecadas e fixadas em solução de formalina tamponada (pH 7,3), e então incluídas em um bloco de resina autopolimerizável incolor. Para tanto, moldes de silicona pesada sob medida para as dimensões médias das tíbias foram realizados. Os blocos foram cortados no sentido longitudinal das tíbias, com auxílio de um disco diamantado, montado em um micromotor. A área do corpo ósseo selecionada para análise correspondeu ao tecido localizado entre o término da cortical da cabeça articular em direção ao corpo ósseo, totalizando a dimensão de $3,5\text{mm}^2$ de osso trabecular. As secções frontais das cabeças das tíbias foram coradas com azul de toluidina e examinadas em estereomicroscópio marca Olympus modelo SZS 1145, com aumentos de 20X, para captura da imagem com câmera Sony Cyber-shot P-92 (Anexo 2A). A análise do percentual de trabéculas ósseas foi realizada em um computador Macintosh, utilizando o programa de domínio público NIH IMAGE, desenvolvido pelo U.S. National Institutes for Health e disponível na Internet na página <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. Para tanto, uma área determinada para cada amostra foi escolhida, tendo uma dimensão vertical padronizada de 18 polegadas quadradas, e sendo de

largura equivalente a toda a extensão de tecido ósseo medular (entre corticais direita e esquerda). O posicionamento da área pré-determinada para a análise foi situado logo abaixo do primeiro milímetro a partir da epífise em direção distal ao osso, com o objetivo de excluir a esponjosa primária (Cui et al., 2004). Como as áreas totais selecionadas (em polegadas quadradas) apresentavam variações entre as amostras, a área de preenchimento por tecido ósseo trabecular de cada amostra (identificada pelo programa) foi dividida pelo somatório de sua área total de tecido medular, permitindo a verificação do percentual de preenchimento ósseo trabecular. O posicionamento da área de análise em cada amostra e a operação do programa de cálculo foram realizados por um examinador treinado e não participante das condutas experimentais do presente estudo (Anexo 2B).

Análise estatística:

A: Peso Corporal:

O parâmetro peso corporal foi analisado comparativamente através de médias e desvios-padrão no momento do *baseline* e ao final dos períodos observacionais do estudo, para todos os animais experimentais. As médias entre os grupos foram comparadas através de Teste-t de Student a um nível de significância de 5%.

B: Densitometria óssea:

As médias dos valores de densitometria óssea nos animais teste e controle (área óssea, densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO)) foram comparadas através de Teste-t de Student, a um nível de significância de 5%. Adicionalmente, os valores do BMC entre 30 e 60 dias foram analisados através da comparação de médias por Teste-t de Student, a um nível de significância de 5%.

C: Análise da área trabecular de cortes sagitais em tíbias:

Foram calculadas médias e desvios-padrão do percentual de preenchimento por trabéculas ósseas no tecido ósseo medular das tíbias dos animais dos grupos teste e controle. A comparação das médias das áreas entre os dois grupos foi realizada através de teste-t de Student, a um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

A Figura 1 mostra os resultados da análise de concordância e reprodutibilidade dos exames de densitometria óssea para o animal em estudo. Valores relativos ao BMC fornecidos através de 10 testes seqüenciais com reposicionamento do mesmo animal, com a posição padrão para a realização dos demais exames, são apresentados. A média, desvio-padrão e coeficiente de variação para os 10 valores de BMC foram calculados. O baixo valor do coeficiente de variação é um indicativo da adequada precisão do exame para os propósitos do estudo.

<i>Medições</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
BMC	9,494	9,559	9,567	9,592	9,561	9,706	9,491	9,551	9,650	9,513
Média	9,568									
Desvio-padrão	0,067									
Coeficiente de Variação	0,7%									

Figura 1: Análise de concordância e reprodutibilidade dos exames de densitometria óssea para o animal em estudo. Valores relativos ao BMC fornecidos através de 10 testes seqüenciais com reposicionamento do mesmo animal. A média, desvio-padrão e coeficiente de variação para os 10 valores de BMC foram calculados.

A figura 2 apresenta as comparações dos pesos dos animais experimentais que foram sacrificados no momento observacional de 30 dias do estudo, no momento do *baseline* e aos 30 dias. No *baseline*, os animais do grupo teste mostraram-se significativamente mais pesados que os do grupo controle. Entre os momentos do *baseline* e dos 30 dias, todos os animais

experimentais apresentaram aumento significativo de peso. Aos 30 dias, os animais do grupo teste apresentaram-se, novamente, significativamente mais pesados que os do grupo controle.

PESO – COMPARAÇÃO ENTRE BASELINE E 30 DIAS				
<i>Ratos 30 dias no Baseline</i>		<i>30 dias</i>		
<i>Grupo Teste</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Teste</i>	<i>Grupo Controle</i>	
231	219	327,5	248	
257	186	307,5	273,5	
290	216	321,5	309	
265	240	282,5	288	
256	262	292,5	257	
240	224	290	263	
227	222	268,5	275	
Médias	252,28	224,14	298,5	273,35
Desv.-pad.	21,84	23,22	21,27	20,43
Teste –t (p): Teste (Baseline X 30 dias): 0,001		Controle (Baseline X 30 dias): 0,001		
Teste X Controle Baseline: 0,018		Teste X Controle 30 dias: 0,021		

Figura 2: Valores relativos ao Peso dos animais dos grupos experimentais teste e controle que foram sacrificados 30 dias após a colocação das ligaduras para indução de Periodontite. Os valores de peso são apresentados, para os mesmos animais, no momento do *baseline* e aos 30 dias. Os valores de *p* após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores avaliados são apresentados na porção inferior da figura.

A figura 3 apresenta as comparações dos pesos dos animais experimentais que foram sacrificados no momento observacional de 60 dias do estudo, no momento do *baseline* e aos 60 dias. No *baseline*, os animais do grupo controle mostraram-se significativamente mais pesados que os do grupo teste. Entre os momentos do *baseline* e dos 60 dias, tanto os animais teste quanto os controle aumentaram significativamente de peso. Aos 60 dias, não foram observadas diferenças significativas (os animais do grupo teste ganharam mais peso que os controle).

PESO – COMPARAÇÃO ENTRE BASELINE E 60 DIAS				
	<i>Ratos 60 dias no Baseline</i>		<i>60 dias</i>	
	<i>Grupo Teste</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Teste</i>	<i>Grupo Controle</i>
	235	248	350	325
	187	227	332	350
	214	247	379	320
	231	252	312	370
	257	266	375	394
	234	240	350	374
	250	266	380	387
Médias	229,71	249,42	352,7	367,4
Desv.-pad.	23,36	13,87	25,89	29,17
Teste –t (p):	Teste (Baseline X 60 dias): 0,000		Controle (Baseline X 60 dias): 0,000	
	Teste X Controle Baseline: 0,039		Teste X Controle 60 dias: 0,345	

Figura 3: Valores relativos ao Peso dos animais dos grupos experimentais teste e controle que foram sacrificados 60 dias após a colocação das ligaduras para indução de Periodontite. Os valores de peso são apresentados, para os mesmos animais, no momento do *baseline* e aos 60 dias. Os valores de *p* após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores avaliados são apresentados na porção inferior da figura.

A figura 4 mostra os resultados comparativos entre os grupos teste e controle dos parâmetros área óssea, densidade mineral óssea (BMD) e conteúdo mineral ósseo (BMC), analisados através de densitometria óssea, e o peso dos animais, ao término de 30 dias após terem sido colocadas as ligaduras para indução de periodontite nos animais do grupo teste. Os valores estão dispostos individualmente, tendo as médias de cada parâmetro avaliado sido comparadas entre os grupos por Teste-t de Student a um nível de significância de 5 %. Nesta tabela pode-se observar a ausência de diferenças significativas entre os valores relativos à BMD e BMC. O peso dos animais apresentou diferenças significativas entre os grupos aos 30 dias, sendo os valores médios deste parâmetro maiores nos animais do grupo teste do que no grupo controle. A média dos valores da área de tecido ósseo calculada para o grupo teste apresentou-se significativamente semelhante à do grupo controle.

Na figura 5 estão expressos os valores dos parâmetros BMD, BMC, área óssea e peso dos animais teste e controle, individualmente, 60 dias após a indução de periodontite. A comparação das médias por teste-t de Student a 5% de significância mostrou não haver diferenças significativas entre os grupos para os parâmetros BMD e BMC. Diferentemente do que foi observado aos 30 dias, o peso dos animais do grupo teste não mostrou diferenças significativas quando comparado ao do grupo controle, enquanto a área de tecido ósseo calculada em valores médios para o grupo teste apresentou-se significativamente menor do que aquela medida para o grupo controle.

DENSITOMETRIA ÓSSEA 30 DIAS								
<i>Grupo Teste</i>				<i>Grupo Controle</i>				
Área	BMC	BMD	Peso	Área	BMC	BMD	Peso	
61	9,7191	0,1588	327,5	57,0260	7,8824	0,1382	248	
60	8,7809	0,1459	307,5	59,4999	8,3900	0,1410	273,5	
63,6301	9,4846	0,1491	321,5	62,4622	9,1508	0,1465	309	
59,7972	8,5609	0,1432	282,5	58,7142	8,6562	0,1474	288	
59,0964	8,3674	0,1416	292,5	56,1448	7,9577	0,1417	257	
59,2345	8,4732	0,1430	290	56,1660	8,1766	0,1456	263	
55,9855	7,7715	0,1388	268,5	57,1004	8,5957	0,1505	275	
Médias	60	8,7368	0,1457	298,5	58,1590	8,4013	0,1444	273,35
Desv.-pad.	2,3141	0,6701	0,0065	21,27	2,2751	0,4436	0,0042	20,43
Teste -t (p):	Área: 0,093		BMC: 0,145		BMD: 0,327		Peso: 0,021	

Figura 4: Valores relativos a Área Óssea, Conteúdo Mineral Ósseo (BMC), Densidade Mineral Óssea (BMD) e Peso dos animais dos grupos experimentais em exame de Raio-X de dupla energia (Densitometria Óssea) 30 dias após a colocação das ligaduras para indução de Periodontite. O valor de p após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores dos parâmetros avaliados é apresentado na porção inferior da figura.

DENSITOMETRIA ÓSSEA 60 DIAS								
<i>Grupo Teste</i>				<i>Grupo Controle</i>				
	Área	BMC	BMD	Peso	Área	BMC	BMD	Peso
	59,9034	9,3880	0,1567	350	63,3752	9,4727	0,1495	325
	62,4304	9,5006	0,1522	332	58,5868	8,6084	0,1469	350
	61,2624	9,1179	0,1488	379	56,4633	8,2871	0,1468	320
	60,7103	9,1628	0,1509	312	63,2054	9,2909	0,1470	370
	55,4971	8,6320	0,1555	375	61,5278	9,5685	0,1555	394
	55,0724	8,3886	0,1523	350	62,9081	9,5769	0,1522	374
	51,1015	7,4543	0,1459	380	64,0866	10,2037	0,1592	387
Médias	57,9968	8,8063	0,1517	354	61,4504	9,2869	0,1510	360
Desv.-pad.	4,1566	0,7162	0,0037	25,89	2,8559	0,6453	0,0048	29,17
Teste –t (p):	Área: 0,047		BMC: 0,105		BMD: 0,376		Peso: 0,345	

Figura 5: Valores relativos a Área Óssea, Conteúdo Mineral Ósseo (BMC), Densidade Mineral Óssea (BMD) e Peso dos animais dos grupos experimentais em exame de Raio-X de dupla energia (Densitometria Óssea) 60 dias após a colocação das ligaduras para indução de Periodontite. O valor de p após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores dos parâmetros avaliados é apresentado na porção inferior da figura.

A figura 6 mostra os resultados da comparação dos valores do BMC nos mesmos grupos entre os momentos de 30 e 60 dias após a colocação das ligaduras (análise entre os grupos teste aos 30 e 60 dias e entre os grupos controle aos 30 e 60 dias). O grupo controle mostrou ter

apresentado um contínuo crescimento ósseo, com valores de BMC significativamente maiores aos 60 dias comparativamente aos 30 dias. Os animais do grupo teste apresentaram um desenvolvimento ósseo comprometido, com valores de BMC significativamente semelhantes aos 30 e 60 dias.

COMPARAÇÃO BMC ENTRE 30 E 60 DIAS			
Teste 30 dias	Teste 60 dias	Controle 30 dias	Controle 60 dias
9,71	9,38	7,88	9,47
8,78	9,5	8,39	8,6
9,48	9,11	9,15	8,28
8,56	9,16	8,65	9,29
8,36	8,63	7,95	9,56
8,47	8,38	8,17	9,57
7,77	7,45	8,59	10,2
Médias 8,732	8,80	8,397	9,281
Teste –t (p):			
	0,856		0,001

Figura 6: Comparação dos valores relativos ao BMC entre os animais teste aos 30 e 60 dias, e entre os animais controle aos 30 e 60 dias. A figura apresenta as médias dos valores a cada momento observacional. O valor de p após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores avaliados é apresentado na porção inferior da figura.

A figura 7 mostra os resultados obtidos com a análise do percentual de preenchimento por osso trabecular da área total de osso medular nas tíbias dos animais experimentais. A comparação das médias percentuais obtidas para os grupos teste e controle por Teste-t de Student a 5% de significância demonstrou não haver diferenças significativas entre as mesmas, tendo havido, no entanto, maior preenchimento ósseo trabecular nas tíbias dos animais do grupo controle.

<i>Animais</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>Média</i>	<i>Desv.-pad.</i>
Teste	24%	59%	30%	44%	26%	22%	34%	34%	13,22
Controle	34%	31%	48%	37%	34%	44%	62%	41%	10,89
<i>Teste-t (p)</i>	<i>0,1412</i>								

Figura 7: Valores referentes aos percentuais de preenchimento da área correspondente ao osso medular por trabéculas ósseas nas tíbias dos animais dos dois grupos experimentais, 60 dias após a colocação das ligaduras para indução de periodontite. O valor de p após a realização de Teste-t de Student a 5% de significância para comparação entre os grupos das médias dos valores dos parâmetros avaliados é apresentado na porção inferior da figura.

5. DISCUSSÃO

A extrapolação dos achados clínicos do presente estudo para seres humanos diretamente não é adequada (“o homem não é um rato gigante” – Allmon, 1971). Deve-se ter, ao trabalhar com estudos em animais, o cuidado de reconhecer as limitações inerentes a este modelo experimental, mas compreendendo sua importância como sendo a base inicial para o estudo de processos biológicos que, posteriormente, poderão ser adequadamente investigados e estudados em seres humanos. Ignorar esse fato seria também uma imprudência, visto que existem similaridades importantes entre sistemas orgânicos destes animais com os dos seres humanos.

Na atualidade, os desenhos experimentais onde o rato é empregado vêm sendo aplicados para estudar uma série de eventos relacionados a várias doenças. Os sistemas e a fisiologia do rato assemelham-se aos do ser humano de forma a permitir a realização de estudos onde o ser humano não poderia ser empregado como elemento experimental (Klausen, 1991; Susin e Rösing, 2002). Os modelos experimentais que incluem o rato permitem que seja observado o impacto de um processo patológico determinado e isoladamente presente sobre um determinado desfecho em estudo, o que dificilmente é possível de ser encontrado em humanos. Além disso, os aspectos éticos concernentes ao fato de se permitir o estudo do impacto de uma doença de caráter evolutivo e cumulativo sobre o aparecimento de outra em humanos, já havendo plausibilidade biológica para suspeitar da sua inter-relação, tornam a execução de estudos desta natureza inviável. Também é importante salientar que, dentro das características próprias do modelo animal, estudos em ratos ainda permitem o controle de fatores genéticos, ambientais e

microbiológicos, por exemplo. Desta forma, buscaram-se resultados e viabilidade futura para aplicação das informações adquiridas aos seres humanos (Klausen, 1991; Susin e Rösing, 2002).

No presente estudo, periodontite foi induzida através de colocação de ligaduras ao redor de um dente molar de cada animal experimental, com o intuito de instalar na área intracrevicular um fator retentivo de bactérias oriundas da cavidade bucal, de tal forma a induzir a formação de um biofilme subgingival e então, sucessivamente, a instalação de um processo inflamatório que determina a ocorrência de perdas ósseas localizadas no osso alveolar, bem como a perda progressiva da inserção clínica periodontal ao redor destes dentes. Na literatura podemos encontrar uma série de estudos que, com metodologias semelhantes de indução de periodontite, permitiram a observação de diferentes graus de perdas de inserção periodontal ao redor dos dentes afetados, determinando como sendo adequado o uso da ligadura para estudos onde o desfecho a ser analisado depende da ocorrência de periodontite de uma forma semelhante à que ocorre e evolui em seres humanos (Fiehn, Klausen e Evans (1992); Breivik et al (2000); Orrico et al (2005); Leite et al. (2005)).

Os períodos de observação do estudo (30 e 60 dias) foram assim estipulados para que pudesse ser testada a evolução do processo inflamatório periodontal em graus mais agravados, mas sem que os animais experimentais viessem a perder seus dentes pela evolução da migração do epitélio juncional até o ápice dos mesmos. Como o ciclo biológico e o período de vida em ratos são consideravelmente menores do que os observados em seres humanos, também a evolução das doenças periodontais, naqueles, costuma ser mais rápida. Este fato poderia comprometer a análise da continuidade do impacto do processo inflamatório instalado por mais de 30 dias. Um processo inflamatório

de mais longa duração, portanto em uma fase de desenvolvimento onde é característica a síntese e a expressão de um número maior de citocinas inflamatórias no periodonto (Offenbacher et al., 1996) e conseqüentemente uma maior probabilidade de disseminação sistêmica destes mediadores químicos determinando alterações à distância (Loffreda et al., 1998) teria uma suposta interferência maior no padrão de perda óssea sistêmica. Além disso, a característica cumulativa do dano provocado pelo estímulo constante no processo reabsortivo sobre o neoformador de tecido ósseo faria de uma periodontite instalada há mais tempo uma ameaça naturalmente mais impactante na massa óssea sistêmica dos animais experimentais. Para tanto, estimou-se que 60 dias de processo inflamatório seriam de suficiente impacto sobre os desfechos a serem estudados. No entanto, devido à velocidade com que a migração apical do epitélio juncional ocorre em ratos, haveria a possibilidade de, aos 60 dias, haver perdas dentárias em alguns dos animais. Este fato comprometeria a análise adequada dos resultados de uma inflamação periodontal de características semelhantes em todos os animais do grupo experimental.

Como nenhum dos animais sacrificados aos 60 dias apresentou perdas dentárias, estes puderam ser considerados como apresentando condições ideais para terem suas tíbias analisadas através de histomorfometria para cálculo das áreas de preenchimento por tecido ósseo trabecular. Caso tivessem sido observadas perdas dentárias neste grupo, a análise histomorfométrica teria sido realizada no grupo sacrificado aos 30 dias.

Na análise da massa óssea observada no exame de densitometria, tanto o grupo de 30 como o de 60 dias foram incluídos, pois havia a suspeita de que a magnitude do processo inflamatório já pudesse interferir na massa óssea sistêmica em um período curto de instalação (30 dias).

Os resultados do presente estudo mostram que a presença de atividade inflamatória localizada em um determinado órgão ou parte específica do organismo (no caso a periodontite) apresenta impacto sobre as condições ósseas sistêmicas, em concordância com outros estudos (Heinrich et al., 2003; Ishihara & Hirano, 2002; Tracy, 2003), onde processos inflamatórios oriundos de outras doenças também assim puderam influenciar. Como a magnitude do processo inflamatório (no periodonto ao redor de um único dente molar) pode ser considerada pequena, e como os animais ainda apresentavam-se em processo contínuo de desenvolvimento corporal, os resultados não revelaram alterações significativas na massa óssea sistêmica observada através da comparação dos valores de densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo entre os grupos experimentais, aos 30 e 60 dias. No entanto, a área de tecido ósseo, mensurada nestes mesmos momentos observacionais do estudo, apresentou-se, nos animais sacrificados aos 30 dias, maior nos animais do grupo teste (com doença periodontal) do que nos animais do grupo controle (sem doença). Aos 60 dias, no entanto, esta relação se inverteu, sendo a área de tecido ósseo significativamente maior no grupo controle do que no grupo teste.

A comparação do parâmetro peso corporal dos animais entre os momentos de *baseline* e 30 dias, e entre *baseline* e 60 dias, reforça as conclusões acerca da limitação no desenvolvimento ósseo dos animais revelada pela análise da área óssea dos mesmos. A influência do processo inflamatório periodontal instalado com pouco tempo de evolução foi pequena, e com expressão restrita sobre o desenvolvimento ósseo dos animais. Porém, a comparação do peso corporal entre *baseline* e 60 dias mostrou que a periodontite instalada, como único processo patológico capaz de acometer o desenvolvimento corpóreo dos animais, determinou uma impactação no padrão de desenvolvimento ósseo, ao contrário do que foi observado até os 30 dias (grupo teste continuou mais pesado que o

grupo controle, à semelhança do que fora observado no baseline, e com área óssea semelhante), aos 60 dias os animais do grupo haviam ganho mais peso do que os do grupo controle, mas apresentando área óssea significativamente menor. Tais comparações nos permitem concluir que a presença do processo inflamatório localizado no periodonto dos animais do grupo teste interferiu no padrão de crescimento ósseo normal dos animais experimentais. Estes dados apontam para o fato do montante de processo inflamatório instalado pela indução de periodontite ter influenciado no processo natural de formação/reabsorção óssea sistemicamente, porém sem afetar o desenvolvimento físico geral dos animais, provavelmente não trazendo comprometimentos no seu padrão orgânico, alimentar ou comportamental.

A comparação dos valores de BMC nos mesmos grupos entre os períodos de 30 e 60 dias revelou ter o grupo controle apresentado um contínuo crescimento ósseo, portanto tendo, além da área maior, também maior aquisição de conteúdo mineral ósseo, mostrando dimensões ósseas maiores. O grupo teste, no entanto, apresentou conteúdo mineral ósseo compatível com sua menor área, reforçando os indícios de desenvolvimento ósseo comprometido.

O exame das condições macroscópicas do esqueleto através do emprego da densitometria óssea vem sendo aplicado com regularidade para o diagnóstico das situações que envolvem a osteopenia e a osteoporose em humanos. O software empregado para a realização do mesmo exame em pequenos animais permite a realização deste exame em ratos, com um nível relativamente satisfatório de precisão. Os resultados deste exame mostram o significado da perda quantitativa da massa óssea sistêmica sobre a observação macroscópica do esqueleto dos animais estudados. No entanto, estes resultados serão relevantes e identificáveis se forem expressões de alterações de

magnitudes suficientes para que o exame possa detectar diminuições consideráveis ao ponto de denunciar os valores reduzidos de conteúdo e densidade mineral óssea. Nesta interpretação, o tecido ósseo cortical apresenta grande influência sobre o cálculo total da área de tecido ósseo mensurada, e sobre os parâmetros envolvendo a quantidade de tecido ósseo. Por outro lado, foi suficientemente comprovado na literatura que o início das perdas ósseas capazes de configurar, de acordo com seu padrão de evolução, uma massa óssea sistêmica de expressiva diminuição se dá em tecido medular. As trabéculas, afetadas diretamente pela evolução da perda quantitativa de tecido ósseo, começam a apresentar-se de menor espessura, com áreas cada vez maiores de espaço intertrabecular. Desta maneira, é esperado que, quando alterações de menor magnitude mas ainda assim capazes de influenciar no metabolismo ósseo diminuindo a massa óssea venham a ocorrer, as evidências deste processo sejam mais facilmente identificadas em análises do conteúdo especificamente trabecular do que na mensuração do tecido ósseo corpóreo como um todo, incluindo as áreas trabeculares e corticais conjuntamente. Assim, o exame de densitometria óssea, onde o osso cortical (provavelmente ainda não tão comprometido a ponto de denunciar perda na massa óssea sistêmica) apresenta-se como determinante no cálculo final dos parâmetros avaliados, é pouco sensível para detectar a expressão óssea sistêmica do processo inflamatório induzido em um dente somente. Seria interessante, a partir dos resultados deste estudo, a realização de outros estudos visando verificar o impacto de periodontite instalada em mais de um dente de cada animal experimental sobre as condições ósseas dos mesmos em avaliação através da densitometria óssea. Deve-se atentar, entretanto, para a possibilidade de eventos inflamatórios de maior magnitude interferirem em funções orgânicas naturais nestes animais, que teriam o poder de gerar por

si só alterações na massa óssea sistêmica, e assim funcionando como importantes vieses de confusão.

Os resultados do presente estudo não apresentaram diferenças significativas com relação ao percentual de preenchimento por trabéculas ósseas das áreas totais de osso medular nas tíbias dos animais teste e controle, em exame histomorfométrico através de visualização por estereomicroscópio. Houve, no entanto, uma menor presença de trabéculas ósseas nos animais do grupo teste (médias percentuais de preenchimento ósseo na ordem de 34% para o grupo teste e 41% para o grupo controle), condição observada na ocorrência de osteoporose em seres humanos.

Em estudos onde as observações de resultados expressam a relevância de um determinado fator em estudo em provocar ou modificar um desfecho a ser mensurado, o número da amostra em cada grupo (teste e controle) é fundamental. Se o efeito provocado pelo fator em estudo exerce uma influência forte o suficiente para gerar um impacto importante no desfecho, eventualmente um número menor de animais já poderia ser suficiente para que se obtenha resultados significativamente diferentes entre os grupos. No entanto, onde o fator em estudo apresenta um menor impacto sobre a ocorrência do desfecho, a inobservância de resultados estatisticamente significativos pode estar relacionada a um número reduzido de animais experimentais. No presente estudo, foi observada a existência de um impacto da periodontite sobre a massa óssea sistêmica, porém as diferenças entre os grupos não atingiram significância estatística, provavelmente por ser o efeito inflamatório instalado de modesta magnitude para atingir significância com este tamanho de amostra. Um número relativamente pequeno de animais foi empregado em cada grupo experimental, à semelhança de outros estudos onde o modelo animal em ratos para verificar a relação da periodontite com condições sistêmicas ou de

periodontopatógenos com regimes antibioticoterápicos foi utilizado. Nos estudos de Fiehn, Klausen e Evans (1992) e Breivik et al (2000) foram utilizados 10 ratos para cada grupo experimental; no estudo de Orrico et al (2005), 9 animais por grupo; e nos estudos de Chang et al. (1994) e Leite et al. (2005), 6 animais por grupo. Em todos estes estudos, periodontite foi induzida através da colocação de ligaduras, de forma semelhante à realizada no presente trabalho. No momento da realização deste estudo, também a disponibilidade reduzida no fornecimento de animais no biotério da Coordenação de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde quando da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS, contribuiu para o menor número de animais. A liberação de animais para estudos desta natureza dependeu do montante numérico da reprodução e preparo destes no momento, bem como do número de solicitações de ratos Wistar para os diversos estudos científicos que iniciavam naquele período.

O tamanho da amostra, no presente estudo, foi estipulado baseando-se em estudos anteriores com indução de periodontite através da colocação de ligaduras. O cálculo de amostra fica comprometido pois, para que seja feito, há a necessidade de estipular, arbitrariamente, qual a diferença entre os grupos que se quer testar. Estudos pioneiros têm o potencial de revelar a força e o impacto da influência do fator em estudo sobre o desfecho, assim possibilitando o acerto, de forma mais favorecida, de um número amostral apropriado para a relação estabelecida previamente. O presente estudo pioneiro sugere a condução de investigações adicionais com vistas à verificação da influência de periodontite localizada em mais de um dente em ratos, com um tamanho amostral maior, sobre a massa óssea sistêmica dos animais.

6. CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados do presente estudo, foi verificado que houve impacto da periodontite sobre a massa óssea sistêmica dos animais experimentais, porém não havendo diferenças significativas entre os grupos teste e controle;
- Não foi observado efeito estatisticamente significativo da periodontite instalada por 30 ou 60 dias sobre a estrutura óssea trabecular das tíbias nos animais do grupo teste, em comparação com os animais do grupo controle;
- Foi observado que a atividade de periodontite esteve relacionada com uma diminuição no padrão de crescimento ósseo sistêmico normal em ratos Wistar, observada na comparação do conteúdo mineral ósseo entre 30 e 60 dias de periodontite instalada, e no parâmetro área óssea ao término dos 60 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* 2003;3:293-8.

Allmon H B. Man Is Not a Giant Rat. *J Public Health Dent* 1971;31:218-224.

Boyce BF, et al. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 1989;125:1142-1150.

Breivik T, et al. Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *Eur J Oral Sci* 2000;108:115-22.

Bullon P, et al. Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. *J Periodontol* 2005;76(4):513-9.

Chambers TJ, Ali HN. Inhibition of osteoclastic motility by prostaglandins I₂, E₁, E₂ and 6-oxoE₁. *J Pathol* 1983;139:383-397.

Chang KM, et al. Tetracyclines inhibit *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism. *J Periodontal Res* 1994;29:242-9.

Cimaz R. Osteoporosis in childhood rheumatic diseases: prevention and therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16:397.

Cui L, et al. Tanshinone prevents cancellous bone loss induced by ovariectomy in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:678-84.

Daci E, Van Cromphaut S, Bouillon R. Mechanisms influencing bone metabolism in chronic illness. *Horm Res* 2002;58(Suppl 1):44-51.

Feyen JHM, et al. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Min Res* 1989;4:633-638.

Fiehn NE, Klausen B, Evans RT. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. *J Periodont Res* 1992;27:609-14.

Genco RJ, Grossi SG. Is estrogen deficiency a risk factor for periodontal disease? *Compend Contin Educ Dent Suppl* 1998;22:S23-9.

Gilles J, et al. Preferential stimulation of interleukin-6 production in bone by cytokines compared with systemic factors. *J Bone Miner Res* 1994;9 (Suppl 1) [Abstract B433].

Heinrich PC, et al. Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003, Pt(): 0.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:357-68.

Jilka RL, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss-mediation by interleukin-6. *Science* 1992;257:88-91.

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62:59-73.

Kurihara N, et al. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990;144:4226-4230.

Kuvin JT, Karas RH. The effects of LDL reduction and HDL augmentation on physiologic and inflammatory markers. *Curr Opin Cardiol* 2003;18:295-300.

Lane NE, Rehman Q. Osteoporosis in the rheumatic disease patient. *Lupus* 2002;11:675-9.

Leite CL, et al. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2005;27:523-31.

Lerner UH. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:481-93.

Loffreda S, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 1998;12:57-65.

Minne HW, et al. Inflammation-mediated osteopenia in the rat: a new animal model for pathological loss of bone mass. *Endocrinology* 1984;115:50-4.

Offenbacher S, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 1996;67:1103-13.

Orrico SR, et al. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol* 2005;76:1436-42.

Pfeilschifter J, et al. Inflammation-mediated osteopenia in the rat: the effects of artificial granuloma and sham operation on cortical and trabecular bone. *Bone* 1985;6:461-5.

Pfeilschifter C, et al. Interleucine-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1989;4:113-118.

Ringe JD. Generalized osteoporosis in chronic polyarthritis-pathomechanisms and treatment approaches. *Z Rheumatol* 1996;55:149-57.

Sallay K, et al. Alveolar Bone Destruction in the Immunosuppressed Rat. *J Periodontal Res* 1982;17:263-274.

Savickiene A, Barauskaite A. Changes in bone mineral density in rheumatoid arthritis. *Medicina (Kaunas)*, 2002;38:190-6.

Smith D, Gowen M, Mundy GR. Effects of interferon gamma and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 1989;120:2780-2783.

Susin C, Rösing CK. O rato como modelo para o estudo das repercussões do estresse nas doenças. *Periodontia* 2002;13:5-10.

Susin, C. Estresse Crônico Variável e Periodontite Induzida por Ligadura em Ratos – Análise Histológica e Radiográfica [dissertação]. Canoas (RS): Universidade Luterana do Brasil; 1999.

Svenungsson E, et al. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* 2003;12:454-61.

Taguchi A. Association between bone mineral density of the general skeletons and jaw bones. *Clin Calcium* 2003;13:565-70.

Takaishi Y, Okamoto Y, Ikeo T, et al. Correlations between periodontitis and loss of mandibular bone in relation to systemic bone changes in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int* 2005;():0.

Taylor GW, et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67:1085-1093.

Tezal M, et al. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 2000;71:1492-8.

Theuma P, Fonseca VA. Inflammation and emerging risk factors in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 2003;3:248-54.

Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med* 1986;164:104-112.

Tracy RP. Inflammation, the metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Int J Clin Pract Suppl* 2003;134:10-7.

Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann Periodontol* 2001;6(1):197-208.

8. ANEXOS

Anexo 1:

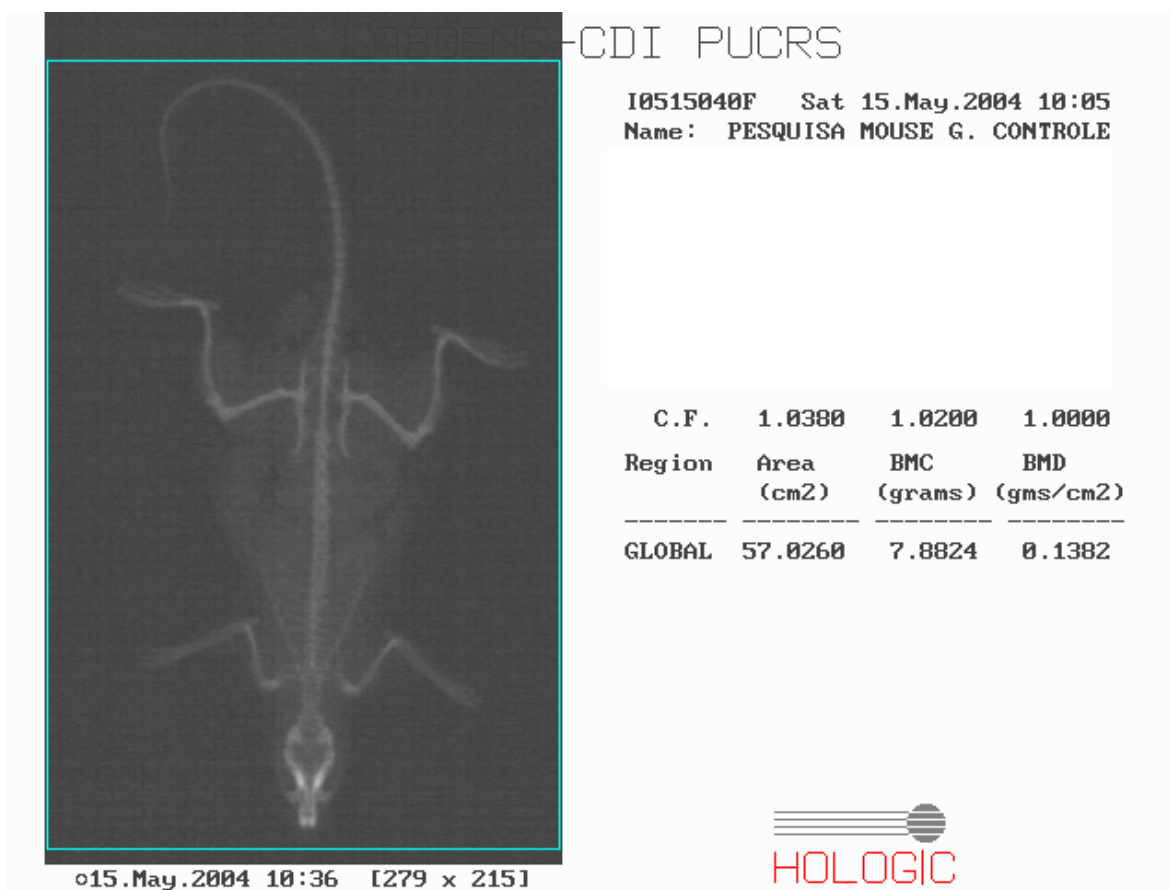
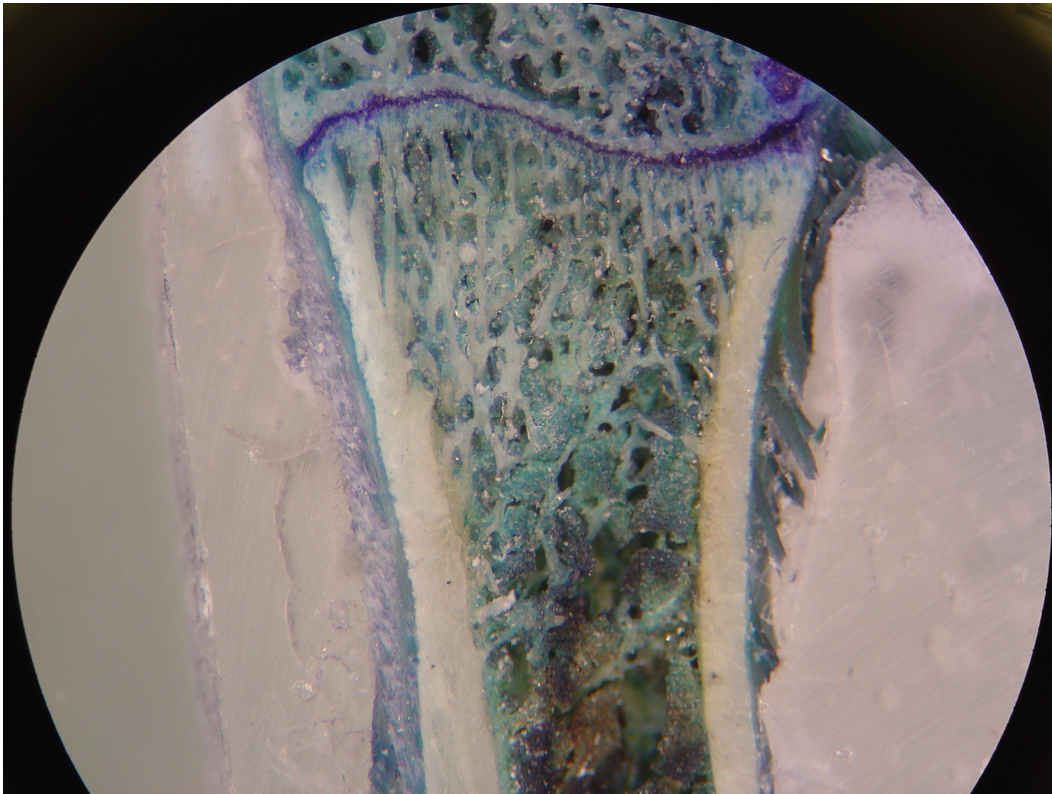


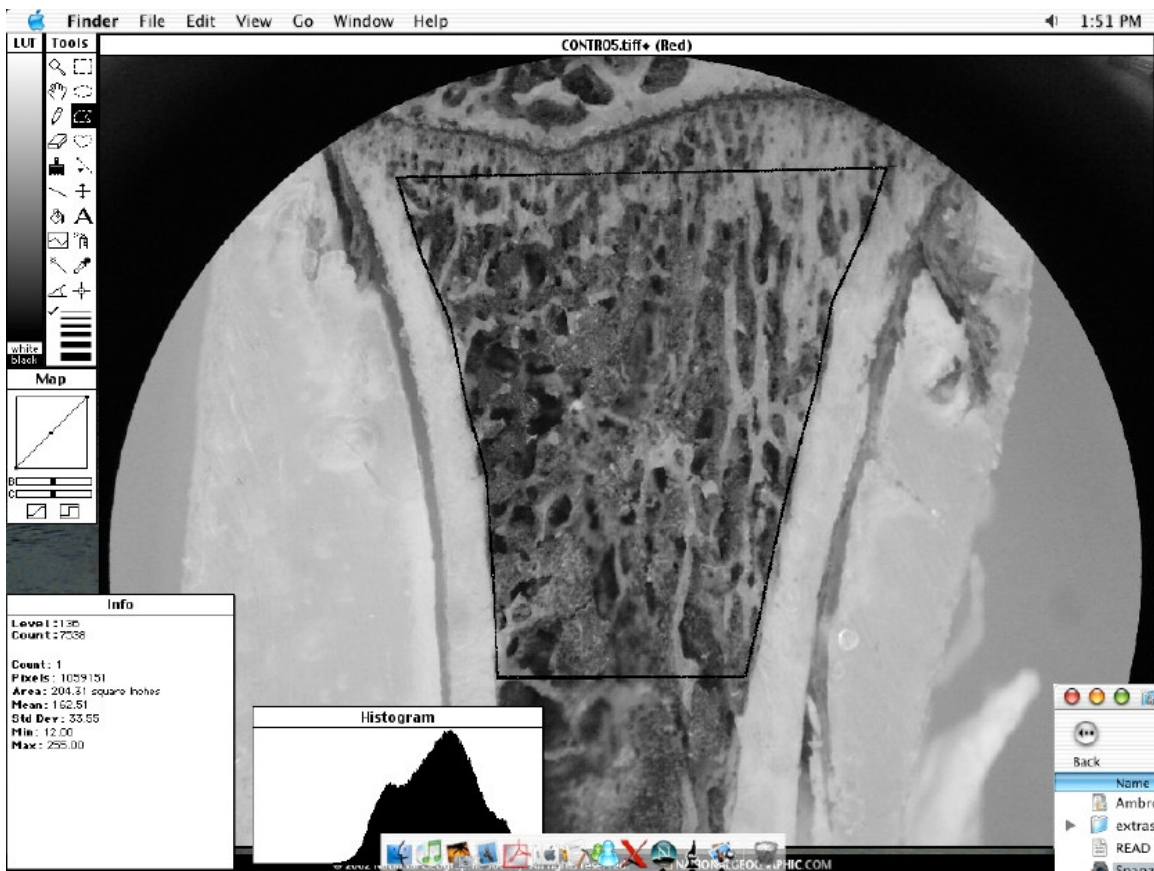
Imagem obtida através do exame de densitometria óssea, com seleção da função específica para pequenos animais, com os resultados das medições de área, conteúdo mineral ósseo (BMC) e densidade mineral óssea (BMD).

Anexo 2:

Seqüência de imagens ilustrando passos da metodologia experimental para análise das imagens obtidas a partir da visualização dos cortes das tíbias:



A: Área do corpo ósseo das tíbias selecionada para análise, correspondente ao tecido localizado entre o término da cortical da cabeça articular em direção ao corpo ósseo, totalizando a dimensão de $3,5\text{mm}^2$ de osso trabecular. As secções frontais das cabeças das tíbias foram coradas com azul de toluidina e examinadas em estereomicroscópio marca Olympus modelo SZS 1145, com aumentos de 20X, para captura da imagem com câmera Sony Cyber-shot P-92.



B: Análise do percentual de trabéculas ósseas, realizada em um computador Macintosh, utilizando o programa de domínio público NIH IMAGE, desenvolvido pelo U.S. National Institutes for Health e disponível na Internet na página <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. A área determinada para cada amostra foi escolhida tendo uma dimensão vertical padronizada de 18 polegadas quadradas, e sendo de largura equivalente a toda a extensão de tecido ósseo medular (entre corticais direita e esquerda). O posicionamento da área pré-determinada para a análise foi situado logo abaixo do primeiro milímetro a partir da epífise em direção distal ao osso, com o objetivo de excluir a “esponjosa primária” (Cui et al., 2004).