

Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP-Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Daniela Vendramê Bertucci

Estudo sobre o efeito do atenolol na mineralização
de dentes e ossos de filhotes de ratas
espontaneamente hipertensas (SHR) e
normotensas

Araçatuba
2009

Daniela Vendramę Bertucci

Estudo sobre o efeito do atenolol na mineralização de dentes e ossos de filhotes de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e normotensas

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Odontopediatria

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA

2009

Catálogo na Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B552e

Bertucci, Daniela Vendrame

Estudo sobre o efeito do atenolol na mineralização de dentes e ossos de filhotes de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e normotensas / Daniela Vendrame Bertucci. - Araçatuba : [s.n.], 2009

84 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Hipertensão 2. Densidade óssea 3. Calcificação fisiológica
4. Atenolol 5. Osteogênese

Black D27

CDD 617.645

Dedicatória

Dedicatória

Ao meus pais Jonas e Marildes,

Pelo amor, pelo carinho, pela dedicação e pelo incentivo. Por estarem sempre ao meu lado, me apoiarem, e me mostrarem o caminho certo nos momentos de incertezas. Por acreditarem em mim e me mostrarem que sou capaz de alcançar meus sonhos. Pelo amparo em todos os momentos de dificuldades. E pelo exemplo de seres humanos honestos, justos, bondosos e amáveis. Devo a vocês tudo o que eu sou e o que conquistei até hoje.

À minha filhinha Alice,

Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado este presente tão maravilhoso. Apesar dos poucos meses de vida e de não ter idéia do quão importante você é para mim saiba que você é a maior riqueza da minha vida, o meu amor, a minha vida. Desculpa a mamãe pela ausência. Espero que os beijos e os amassos possam ter suprido o tempo em que estive distante.

Dedico este trabalho!

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

À **Deus**,

Obrigada Senhor por permitir que eu chegasse até aqui, por mais esta caminhada vencida em minha vida. Por me dar forças para superar todos os obstáculos enfrentados durante esta jornada e me guiar pelo melhor caminho. Por ter me dado uma família tão maravilhosa, e uma filha abençoada que eu amo tanto, e por colocar pessoas tão especiais ao meu redor.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Cristina Antoniali Silva,

Pela enorme dedicação, incentivo e experiência transmitida. Pela amizade e pelo respeito conquistado durante esta jornada. Pelo exemplo de ser humano maravilhoso e compreensivo. Por toda compreensão, apoio e orientação durante os momentos de dificuldade. Pelo exemplo de competência e entusiasmo em adquirir novos conhecimentos.

Ao meu marido André,

Pela paciência com minha ausência e falta de tempo. Pelo amor, pelo carinho e pelo apoio dado a mim durante toda esta caminhada. Te amo muito!

Aos meus irmãos e às minhas cunhadas,

Pelas alegrias, pelas conversas, pela torcida e pelo incentivo.

Ao meu sogro, a minha sogra, ao meu cunhado e a minha concunhada,

Pelos momentos de descontração, pelas conversas e por toda torcida.

À Weglis,

Por estar sempre disposta a ajudar, por ter me socorrido nos momentos de dificuldades, por ser uma pessoa amável e pelo enorme carinho conquistado.

Muito Obrigada!!!

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, nas pessoas de seu Diretor Prof. Tit. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Prof. Adj. Ana Maria Pires Soubhia;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa de seu Coordenador Prof. Adj. Robson Frederico Cunha;

Aos docentes da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Rosângela dos Santos Nery, Prof. Dr. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, Prof. Dr. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon, exemplos de dedicação, pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem, pela ajuda na realização da análise de microdureza.

À Prof.^a Assist. Dr.^a Leda Maria Pescinini Salzedas, pela ajuda na realização da análise radiográfica.

À Prof.^a Assist. Dr.^a Sílvia Helena Venturoli Perri, pela ajuda na realização da análise estatística.

À funcionária da disciplina de Odontopediatria, Maria, por toda ajuda e pela convivência carinhosa que fez com que nós convivêssemos como uma família.

Ao funcionário da disciplina de Odontopediatria, Mário, por todos os momentos de descontração.

À todos os colegas da curso de Pós-Graduação em Odontopediatria (Mestrado e Doutorado) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pela convivência carinhosa e pelas trocas de conhecimentos.

Aos meus colegas de turma de Mestrado Alessandra, Isabelle, Leciana, Lilian, Marcelo e Tatiana, pela convivência harmoniosa, pelas trocas de experiências e pelos momentos de descontração.

Aos docentes, funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pela amizade, companheirismo e apoio durante esta jornada.

Ao Sr Arnaldo César dos Santos funcionário do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, por toda a disposição e ajuda nos cuidados com os animais experimentais.

Aos estagiários e pós-graduandos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pela amizade, pela convivência harmoniosa e pelos momentos de descontração que faziam os dias de tensão mais amenos e agradáveis.

À Sra Marina, Sra Valéria e Sr Diogo, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Sr Cláudio e Sras Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Maria Cláudia, Izamar, Marina, Alexandra e Jéssica pela atenção e afeto que nos recebem.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de recursos (bolsa de Mestrado) que possibilitou a realização deste curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa (2007/06858-6) concedido ao projeto conduzido.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão!!!!

Επίγραφε

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

Resumo

Bertucci DV. Estudo sobre o efeito do atenolol na mineralização de dentes e ossos de filhotes de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e normotensas [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2009.

Resumo

O tratamento da hipertensão durante a gravidez visa diminuir os riscos maternos e fetais. Entre os diferentes tipos de anti-hipertensivos que podem ser utilizados durante este período, estão os antagonistas dos receptores β -adrenérgicos. O atenolol é um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos que atravessa a barreira placentária e é excretado no leite materno chegando com facilidade ao feto de mães tratadas e aos recém-nascidos amamentados. Embora vários estudos em humanos e animais tenham avaliado os efeitos tóxicos do atenolol no período pré-natal (alterações placentárias, retardo de crescimento intra-uterino, diminuição do peso fetal) e pós-natal (diminuição do ganho de peso), pouca atenção foi direcionada aos efeitos do atenolol sobre os tecidos mineralizados, quando administrado durante a organogênese e o período pós-natal. Estudos clínicos e experimentais têm sugerido a participação do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) no metabolismo ósseo e no crescimento dental. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento com atenolol de ratas hipertensas (SHR) e normotensas (Wistar) durante a prenhez e lactação altera a formação dental e óssea dos filhotes. Filhotes de ratas Wistar e SHR não tratadas e tratadas com Atenolol (100mg/kg,v.o) foram sacrificados aos 30 dias de vida e as análises da densidade mineral óssea (DMO), comprimento e largura e de microdureza foram feitas nos dentes incisivos inferiores, crista óssea alveolar, fêmur, tíbia e 4^a vértebra lombar (L4). As imagens digitais foram obtidas em placas ópticas, lidas em escaner a laser e analisadas no programa de computador Digora. As medidas do comprimento e largura foram feitas nas mesmas imagens utilizadas para a análise da DMO, com uso do mesmo programa de computador. A leitura da microdureza do esmalte foi realizada em microdurômetro HMV-2 Shimadzu. Os resultados foram expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e comparados entre os grupos (teste ANOVA, com post-test de Tukey, e teste t de Student não-pareado, $p < 0,05$). Filhotes SHR apresentaram menor DMO de fêmur, tíbia, crista óssea alveolar e 4^a vértebra lombar, menores comprimentos de dente incisivo inferior, fêmur, L4 e menor

comprimento e largura da tíbia do que filhotes de ratas Wistar. O tratamento das ratas com atenolol não alterou a DMO das peças anatômicas de filhotes SHR, porém, diminuiu o comprimento do fêmur, a largura do dente incisivo, a microdureza do fêmur e do esmalte se comparados aos filhotes SHR não tratados. Em filhotes Wistar, o atenolol diminuiu a DMO do fêmur, tíbia, crista óssea alveolar, 4^a vértebra lombar e do dente incisivo. Diminuiu também o comprimento e a largura da tíbia, comprimento e largura da L4, comprimento e largura do dente incisivo inferior, a largura do fêmur se comparados aos filhotes Wistar sem tratamento. O tratamento com atenolol não alterou a microdureza dos tecidos ósseos e dentais de filhotes Wistar. A partir dos resultados apresentados neste estudo, demonstramos que SHR em idade pré-hipertensiva tem alterações importantes de tecidos ósseos e que o atenolol altera a formação e ou desenvolvimento de tecidos mineralizados, o que sugere a participação dos receptores β_1 -adrenérgicos na formação e ou desenvolvimento de tecidos mineralizados.

Palavras-chave: Hipertensão. Densidade Óssea. Calcificação fisiológica. Atenolol. Osteogênese.

Abstract

Bertucci DV. Study of the effect of atenolol on the mineralization of teeth and bone of offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive [dissertation]. Araçatuba: UNESP-São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

Treatment of hypertension during pregnancy aims at reducing the risks for mother and foetus. Among the different types of antihypertensive drugs that may be used during this period are the β -adrenergic antagonists. Atenolol is a selective antagonist towards β_1 -adrenergic receptors, which crosses the placental barrier and is excreted in breast milk coming easily to the fetus of treated mothers and breastfed newborns. Although several studies in humans and animals have evaluated the toxic effects of atenolol in prenatal (placental changes, intrauterine growth-retardation, decreased fetal weight) and postnatal (decreased weight gain) periods, little attention has been directed to the effects of atenolol on mineralized tissues, when administered during organogenesis and postnatal period. Clinical studies with humans and experimental studies with animals have suggested the involvement of the sympathetic autonomic nervous system (SNS) in bone metabolism and in dental growth. The aim of this study was to evaluate whether treatment of hypertensive rats (SHR) and normotensive ones (Wistar) during pregnancy and lactation with atenolol alters bone and dental formation of puppies. Offspring of female Wistar and SHR rats untreated and treated with Atenolol (100 mg / kg, per day) were sacrificed at 30 days and the analyses of bone mineral density (BMD), length and width, and microhardness were made in their lower incisor teeth, alveolar bone crest, femur, tibia and 4th lumbar vertebra (L4). Digital images were obtained with optical plates read in a laser scanner and manipulated in software Digora. The measurements of length and width were performed in the same images obtained for the analysis of BMD, and with the same software. The reading of the enamel microhardness was performed with Shimadzu HMV-2000 microhardness meter. The results were expressed as mean \pm SEM and compared between the groups (ANOVA with Tukey's post-test, and t of Student's test, non-paired, $p < 0.05$). SHR offspring had lower BMD of the femur, tibia, the bone crest and L4, shorter lengths of lower incisor tooth, femur, L4 and shorter lengths and

width of the tibia than Wistar offspring. Treatment of rats with atenolol did not alter the BMD of the anatomical specimens of young SHR, however, it decreased the length of the femur, the width of the incisor, the microhardness of the femur and enamel when compared to non-treated SHR offspring. In Wistar pups atenolol decreased the BMD of the femur, tibia, the bone crest, 4th lumbar vertebra and the incisor tooth. It also decreased the length and width of the tibia, length and width of L4, length and width of the lower incisor tooth, the width of the femur when compared to untreated Wistar pups. The treatment of the rats with atenolol did not alter the microhardness of dental and bone tissues of Wistar pups. From the results presented in this study, we demonstrated that SHR pre-hypertension goes through important changes in bone tissue and that atenolol alters formation and or development of mineralized tissues, suggesting the involvement of β 1-adrenergic receptors in the formation and / or development of mineralized tissues.

Key-words: Bone Density. Calcification, Physiologic. Atenolol. Osteogenesis.

Listas

Lista de Figuras

Figura 1- Curvas dose-efeito do tratamento com atenolol de ratas SHR e Wistar durante os períodos de prenhez e lactação

Figura 2 – Imagens da análise da DMO

Figura 3 – Imagens da análise do comprimento e largura ósseos e dental

Figura 4 – Imagens da análise da microdureza óssea e dental

Figura 5 - Densidade radiográfica do fêmur de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 6 - Densidade radiográfica de tíbia de filhotes de ratas normotensas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 7 - Densidade radiográfica da crista óssea alveolar de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 8 - Densidade radiográfica da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 9 - Densidade radiográfica do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 10 - Comprimento do fêmur de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 11 - Comprimento da tíbia de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 12 - Comprimento da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 13 - Comprimento do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 14 - Largura do fêmur de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 15 - Largura da tíbia de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 16 - Largura da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 17 - Largura do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 18 - Microdureza do fêmur de filhotes de ratas Wistar e ratas SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 19 - Microdureza da tíbia de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 20 - Microdureza da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 21 - Microdureza de esmalte do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Figura 22 - Microdureza de dentina do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar e SHR sem tratamento e tratadas com Atenolol

Lista de Abreviaturas

DMO = densidade mineral óssea

DR = densidade radiográfica

fSHR = filhotes de ratas SHR

fSHRA = filhotes da ratas SHR tratadas com atenolol

fW = filhotes de ratas Wistar

fWA = filhotes de ratas Wistar tratadas com atenolol

L4 = quarta vértebra lombar

OPG = osteoprotogerina

PTH = paratormônio

PTHrP = proteína relacionada ao paratormônio

RANK = receptor ativador de fator nuclear (FN)- $\kappa\beta$

RANKL = ligante de RANK (fator diferenciador de osteoclastos)

SHR = rato espontaneamente hipertenso

SHR-SP= SHR Stroke-Prone

SNS = sistema nervoso autônomo simpático

Sumário

Sumário

1 Introdução	24
2 Proposição	33
3 Materiais e métodos	35
4 Resultados	46
5 Discussão	58
6 Conclusão	70
Anexos	

1 Introdução

1 Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a hipertensão arterial como uma das 10 principais causas de morte no mundo. Existem basicamente dois tipos de hipertensão arterial, a primária, também conhecida como hipertensão arterial essencial, a qual não apresenta causa conhecida e a secundária, que ocorre como conseqüência de alguma causa. A taxa de incidência da hipertensão é de 20 a 30% na população brasileira, sendo 90% do tipo essencial e 10% do tipo secundária (Sociedade Brasileira de Hipertensão).

A hipertensão na gravidez humana apresenta incidência de 5-7% e está associada a significativas complicações maternas, fetais e neonatais (NESS; ROBERTS, 1999). Caso não seja diagnosticada ou tratada, pode evoluir para condições hipertensivas sérias como a pré-eclampsia e eclampsia. Entre as complicações que podem ocorrer devido à hipertensão na gravidez estão retardo de crescimento intra-uterino, baixo peso ao nascimento e recém nascidos pequenos para a idade gestacional (ALMEIDA, 1995). Patologias associadas aos distúrbios de cálcio e magnésio e hormônios relacionados à manutenção das concentrações destes minerais no soro e nos tecidos, como paratormônio (PTH) e calcitonina, também foram diagnosticados em recém-nascidos e crianças de mães hipertensas (GOSHI; IBIDI, 1994). Diferentes medicamentos com ação anti-hipertensiva têm sido utilizados para tratamento da hipertensão, porém, na gravidez algumas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes medicamentos limitam sua utilização devido aos efeitos tóxicos que podem ser produzidos nos fetos (LINDHEIMER et al., 2008; QASQAS et al., 2004).

Associação entre a hipertensão materna e alterações na formação de tecidos mineralizados dos descendentes

A hipertensão na gravidez poderia ser considerada uma condição sistêmica que altera a formação dental, uma vez que Garn et al. (1979) observaram que o diâmetro da coroa de dentes decíduos e permanentes está reduzido em filhos de mães hipertensas. No entanto, estudos epidemiológicos mais recentes não

conseguiram correlacionar diretamente a hipertensão materna e possíveis alterações dentais em crianças (SHULMAN, 2005).

O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é o modelo experimental de hipertensão que mais se assemelha à hipertensão essencial humana. As características hemodinâmicas destes animais são muito semelhantes às observadas em humanos (YAMORI; SWALES, 1994). Filhotes de ratas SHR nascem normotensos e a partir da 8^a. semana de nascimento desenvolvem espontaneamente, ou sem uma causa pré-determinante, um aumento da pressão arterial que atinge níveis próximos a 200 mmHg na 12^a. semana de idade.

Estudos realizados previamente (ELIAS et al., 2006) demonstraram que filhotes machos aos 30 dias de vida, de ratas SHR apresentam uma reduzida microdureza de esmalte e de dentina em dentes incisivos quando comparados aos filhotes de mesma idade de ratas Wistar. Neste estudo avaliamos os dentes de ratos aos 30 dias de vida, pois sendo o dente um tecido que não sofre remodelação, qualquer alteração na sua formação *in útero* poderia ser observada neste período, no qual o desgaste total da coroa que acontece em ratos adultos a cada 45 dias ainda não teria ocorrido. Posteriormente, também observamos reduzida microdureza do esmalte e dentina de dentes molares de filhotes de ratas SHR (ELIAS, 2006). Aos 30 dias, idade pré-hipertensiva, as menores microdurezas de esmalte e dentina de dentes incisivos e molares poderiam ser associadas à hipertensão materna como sugerido anteriormente. No entanto, a possibilidade de estas alterações estarem correlacionadas ao genótipo da “cepa” não pode ser desconsiderada.

Assim como observamos em filhotes de ratas SHR, Ishibashi et al. (1990) observaram alteração na mineralização do esmalte em dentes de ratos adultos hipertensos SHR-SP (SHR stroke-prone). Denominada amelogênese imperfeita, os autores sugeriram que esta alteração seria conseqüente do subdesenvolvimento de ameloblastos, células envolvidas com produção, reabsorção e degradação de matriz de esmalte e transporte de cálcio para mineralização (SASAKI et al., 1997; TAKANO, 1995). Entretanto, variações na concentração de cálcio, assim como de paratormônio (PTH) plasmático, poderiam estar associadas às alterações de formação dental observadas em SHR, uma vez que a existência de receptores de PTH em odontoblastos e na papila dental de camundongos (CALVI et al., 2004), sugere o controle hormonal na odontogênese.

Variações na concentração de PTHrP (proteína relacionada ao PTH) e de cálcio no plasma, no líquido amniótico e no leite de fêmeas SHR têm sido correlacionadas com alterações de crescimento pré e pós-natal de ratos SHR (DI NICOLANTÔNIO et al., 2006; O'DOWD et al., 2008; WLODEK et al., 2000, 2003). Nestes estudos foram avaliados diferentes parâmetros, como a medida do tamanho dos filhotes em idade pré-hipertensiva (14 dias) que foi significativamente menor que ratos normotensos WKY. Porém, não foram avaliadas possíveis alterações na formação e desenvolvimento de tecidos ósseos.

No entanto, Lucas et al. (1986) demonstraram que ratos SHR com idade de 23 semanas apresentam alteração de formação óssea caracterizada por menor densidade óssea do fêmur (expressa pela média do conteúdo mineral por espessura do fêmur). Naito et al. (1993) demonstraram que a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur está diminuída em SHR-SP (6 a 36 semanas). Pereira et al. (2007) também observaram menor DMO do fêmur de SHR. Estas alterações não seriam específicas ao fêmur, uma vez que Inoue et al. (1995) demonstraram que ratos SHR, machos e fêmeas, jovens e velhos apresentam menor DMO na região proximal da tíbia (rica em osso trabecular) que ratos normotensos. Evidências de uma possível correlação entre hipertensão e alterações na DMO também foram obtidas em humanos (AFGHANI; GORAN, 2007).

O uso de antagonistas β -adrenérgicos ou β -bloqueadores no tratamento da hipertensão

Os antagonistas ou bloqueadores de receptores β -adrenérgicos proporcionam uma terapia eficaz para todos os graus de hipertensão. Entre os medicamentos do grupo, foram observadas variações na lipossolubilidade, seletividade para o subtipo de receptor β_1 , presença de atividade simpatomimética intrínseca ou de agonista parcial e nas propriedades estabilizantes da membrana (HOFFMAN, 2007). Porém, apesar destas diferenças, todos os antagonistas de receptores β -adrenérgicos, mostram-se eficazes como medicamentos anti-hipertensivos. Os antagonistas de receptores β -adrenérgicos disponíveis para uso clínico têm sido classificados em antagonistas de receptores β -não seletivos de subtipos (ou de “primeira geração”), antagonistas de receptores β_1 -seletivos (ou de “segunda geração”) e antagonistas

dos receptores β -não seletivos de subtipos ou seletivos de subtipos com ações cardiovasculares adicionais, não correlacionadas ao bloqueio β (ou de “terceira geração”). O atenolol, metoprolol, acetobutolol, mesiprolol e o esmolol exibem atividade ligeiramente maior pelos receptores β_1 do que pelos β_2 , constituindo exemplos de antagonistas β_1 -seletivos ou de segunda geração, apesar desta seletividade não ser absoluta (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

O atenolol tem sido também utilizado como medicamento eficaz para o controle da pressão arterial na gravidez (BARTON et al., 1999; CHUNG et al., 2001; HADDAD; SIBAI, 1999; LINDHEIMER et al., 2008; ZHANG et al., 2000). No entanto, apesar do benéfico efeito anti-hipertensivo sobre a mãe e o feto, estudos clínicos e experimentais (com ratos e coelhos) associaram o tratamento com atenolol a respostas clínicas de toxicidade pré e pós-natal como alterações na placenta, retardo de crescimento intrauterino, redução do peso fetal ou do peso ao nascimento e redução de ganho de peso pós-natal, porém com ausência de malformações congênitas (EASTERLING et al., 2001; TABACOVA et al., 2003). Estes efeitos estariam associados às propriedades farmacocinéticas do atenolol, as quais foram revisadas em estudos anteriores e demonstraram que este medicamento pode atravessar rapidamente a placenta durante a gestação ou prenhez, na prenhez em concentração muito menor (REEVES et al., 1978 apud TABACOVA; KIMMEL, 2002) e se acumular no leite materno durante a fase de lactação (HEBERT et al., 2005; QASQAS et al., 2004), chegando com facilidade até ao feto de mães tratadas e recém-nascidos amamentados.

Em um estudo realizado previamente (ELIAS, 2006) foi observado que o tratamento de ratas SHR, que apresentavam pressão arterial sistólica acima de 150 mmHg, com 100 mg/Kg/dia de atenolol por via oral, reduziu os valores e aboliu as variações de pressão arterial durante os períodos de prenhez e lactação. Neste estudo observamos que o atenolol promoveu efeito tóxico sobre as glândulas salivares de ratos Wistar e SHR filhos de mães tratadas. Observamos que o atenolol reduziu a atividade salivar ao reduzir o peso das glândulas salivares submandibulares, o fluxo salivar e a concentração total de proteínas na saliva. Associado às alterações salivares foi observado um aumento da microdureza tanto do esmalte quanto da dentina dos dentes incisivos dos filhotes (30 dias) de ratas SHR e de ratas Wistar tratadas com atenolol, sem alteração da espessura do

esmalte nos dentes dos filhotes de ratas tratadas (ELIAS, 2006). Estes dados levaram à sugestão de que, independentemente do efeito anti-hipertensivo, uma vez que este efeito também foi observado em filhotes de ratas normotensas, o atenolol interferiria com o processo de formação dental dos filhotes de ratas tratadas durante a prenhez e lactação. Estes resultados demonstraram que a utilização do atenolol nos períodos de prenhez e lactação altera a formação e a atividade dos tecidos avaliados nos filhotes, corroborando os resultados que demonstraram que o atenolol atravessa a placenta e age diretamente sobre o feto em formação e em desenvolvimento intra-útero e no período pós natal, durante a amamentação.

Estudos que avaliaram a toxicidade do atenolol sobre o feto relataram que sua utilização durante o primeiro trimestre de gestação levaria a bebês com menor peso e menor comprimento ao nascimento (LYDAKIS et al., 1999; BAYLISS et al., 2002), retardo do crescimento fetal intra-uterino (EASTERLING et al., 2001; MAGEE et al., 1999 apud BARRILLEAUX; MARTIN, 2002; LIP et al., 1997 apud BARRILLEAUX; MARTIN, 2002).

Não encontramos na literatura estudos que avaliassem o efeito do atenolol quando utilizado nos períodos de gravidez/prenhez e lactação sobre a formação ou desenvolvimento de tecidos ósseos.

Muitos estudos recentes têm apresentado evidências clínicas e experimentais do efeito de antagonistas β -adrenérgicos em tecidos ósseos. As primeiras evidências foram obtidas em estudos que demonstraram que o tratamento com baixas doses de propranolol por 19 dias consecutivos aumentou o índice de aposição mineral do tecido esponjoso ou trabecular, aumento do calo ósseo e união óssea em defeitos ósseos criados no terço médio da diáfise femoral de ratos, preenchidos com matriz óssea desmineralizada (MINKOWITZ et al., 1991). Também foi observado que, em modelo experimental de perda óssea induzida por ausência de carga mecânica, o tratamento por 30 dias consecutivos com propranolol (5g/L, diluído na água de beber) preveniu a perda óssea (ASSEUR et al., 2003). Os primeiros estudos clínicos epidemiológicos demonstraram que o uso de β -bloqueadores, como anti-hipertensivos, estava associado com uma redução de 23-30% no risco de fraturas vertebrais ou não vertebrais (mão, antebraço, pé) em mulheres menopausadas (PASCO et al., 2004; SCHLIENGER et al., 2004). Apesar de efeitos controversos terem sido apresentados, muitos outros estudos demonstraram que o tratamento

com antagonistas β -adrenérgicos estaria diretamente associado com ganho de massa óssea, aumento de densidade óssea e formação óssea em animais e em humanos.

A partir destes dados, foi sugerido que a remodelação óssea seria controlada pelo sistema nervoso central, com participação do sistema autônomo simpático (SNS) como componente periférico e da leptina, como regulador das vias nervosas centrais envolvidas (ELEFTERIOU et al., 2005; TAKEDA et al., 2002). Foi sugerido que receptores β -adrenérgicos em osteoblastos seriam ativados pela noradrenalina, levando à produção da proteína ligante RANK (RANKL) que se ligaria ao receptor ativador de fator nuclear (FN)- $\kappa\beta$ (RANK) e estimularia a formação de osteoclastos. Assim, o efeito dos antagonistas β -adrenérgicos sobre os tecidos ósseos estaria correlacionado com a redução da formação de osteoclastos, inibindo, desta forma, a reabsorção óssea.

Ossos e dentes são tecidos duros especializados que se assemelham entre si. A densidade óssea é mantida por balanço dinâmico entre a formação óssea realizada por atividade de osteoblasto e a reabsorção óssea, pelos osteoclastos. Os componentes mineralizados do dente, além do osso alveolar, consistem do esmalte, dentina e cimento, secretados pelos ameloblastos, odontoblastos e cementoblastos, respectivamente. Similares aos osteoclastos, os odontoclastos reabsorvem a dentina e a matriz extracelular. Fortes evidências experimentais sugerem que o SNS também teria importante papel no metabolismo ósseo mandibular e no crescimento dental (BOGGIO et al., 2004). A polpa dental e culturas de odontoblastos expressam osteoprotegerina (OPG, fator inibidor de osteoclastogenese), RANKL e M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos), fatores envolvidos na regulação da formação do osteoclasto. As proteínas RANKL e OPG foram localizadas em odontoblastos, ameloblastos e células de polpa de dentes de camundongos em desenvolvimento (SHEELA RANI; MAC DOUGALL, 2000), assim como no botão epitelial, nos epitélios internos e externos e no mesênquima da papila dental (OHAZAMA et al., 2004), sugerindo a participação destas no desenvolvimento dental. Não encontramos na literatura estudos que avaliassem o efeito de β -bloqueadores sobre a formação e desenvolvimento de tecidos mineralizados (ósseo e dental) durante o período intra-uterino e pós-natal (30 dias).

Havendo efeito sobre a formação e/ou desenvolvimento de tecidos mineralizados, provavelmente encontraríamos alterações importantes nos parâmetros anatômicos dos ossos e dentes, como comprimento e largura, na DMO e também na força óssea e dental, podendo a última ser medida pela microdureza, em filhotes de ratas tratadas com atenolol.

A força óssea é influenciada por diferentes fatores. Além da massa, tamanho, geometria e microarquitetura, a força óssea é também influenciada pelas propriedades intrínsecas do material do tecido. Estas incluem a mineralização do osso e as características da matriz orgânica (orientação e estrutura química das fibras colágenas), o acúmulo de microdanos, e indiretamente, a apoptose dos osteócitos (CURREY, 1975; KRUIK; RITCHIE, 2008; PETERLIK et al., 2006; SEEMAN; DELMANS, 2006). A “qualidade” óssea é também profundamente influenciada pela taxa de *turnover* ósseo (DEMPSTER, 2002). O grau de mineralização óssea influencia não somente a resistência mecânica do osso (FOLLET et al., 2004) mas também determina parcialmente a sua DMO (BOIVIN et al., 2008).

A medida da dureza é uma maneira de se avaliar a resistência de um material à deformação, ou seja, a habilidade de um material de resistir a uma força exercida por uma carga com ou sem marcação permanente (CURREY, 2003; OYEN, 2006; RITCHIE et al., 2005). O teste de microdureza permite investigar a relação entre a estrutura e as características mecânicas de um material em uma escala microestrutural.

Sabendo que o tecido ósseo torna-se mais frável quando ocorre um excesso no conteúdo mineral chegando um valor crítico e também torna-se menos hábil a suportar carga quando o conteúdo mineral está muito baixo (CURREY et al., 2001; ZIOUPOS et al., 2000), podemos avaliar indiretamente possíveis alterações na formação óssea com a avaliação da dureza destes tecidos.

A qualidade dental, que seria relacionada à habilidade do dente em preencher suas funções de sustentar as forças mastigatórias, pode ser avaliada através das medidas de seu material, suas propriedades mecânicas e estruturais. A microdureza do esmalte estaria diretamente relacionada ao seu grau de mineralização uma vez que, o esmalte é composto basicamente por conteúdo mineral (96-98%), diferente da dentina, que apesar de ser também composta em sua maior parte por conteúdo

mineral (70%), possui uma quantidade maior de tecido orgânico (30%), o qual teria uma certa influência na sua microdureza.

Considerando os dados acima citados, formulamos a hipótese de que o tratamento de ratas com atenolol, durante os períodos de prenhez e lactação alteraria a formação e/ou desenvolvimento ósseo e dental dos filhotes.

2 Proposição

2 Proposição

O objetivo geral do nosso estudo foi avaliar o efeito dos receptores β_1 -adrenérgicos, antagonizados pelo atenolol, durante os períodos de prenhez e lactação, sobre a mineralização de ossos e dentes de filhotes SHR.

Os experimentos foram realizados com o objetivo de se responder as seguintes perguntas:

- 1- Ratos SHR pré-hipertensos apresentam alterações de mineralização em ossos e dentes?
- 2- O tratamento da hipertensão materna com atenolol reverte possíveis alterações encontradas nos filhotes?
- 3- O bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos, realizado pelo atenolol, altera a mineralização de ossos e dentes?

3 Materiais e

Métodos

3 Materiais e Métodos

Os experimentos conduzidos neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP, de acordo com o protocolo no. 2007-003175. Certificado em anexo (Anexo A).

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

No presente estudo foram utilizados filhotes machos, aos 30 dias, de ratas Wistar e SHR, tratadas ou não com Atenolol. Os ratos Wistar (machos e fêmeas) foram fornecidos pelo biotério do Campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP). Os ratos SHR (machos e fêmeas) eram provenientes de uma cepa mantida pelo biotério do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) no biotério do referido departamento e receberam ração padrão e água “*ad libitum*”.

3.2 MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL

Os filhotes foram obtidos a partir do acasalamento de ratos machos e fêmeas Wistar com pressão arterial sistólica (PAS) próxima a 112mmHg e ratos machos e fêmeas SHR com PAS igual ou superior a 150mmHg. A medida da PAS foi realizada pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos (Plethysmograph Physiograph® MK-III-S / NBS – Narco Bio-Systems / Houston, Texas, USA).

3.3 TRATAMENTO

Em experimentos piloto o efeito anti-hipertensivo do atenolol foi testado em ratas SHR. Analisando as curvas dose-efeito, observamos que a dose 100mg/kg foi a menor dose com efeito anti-hipertensivo significativo em SHR, sem causar alteração na PAS de ratas Wistar (Fig. 1). A medida da PAS foi realizada pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos (Plethysmograph Physiograph® MK-III-S / NBS – Narco Bio-Systems / Houston, Texas, USA) nos dias 0, 7, 14, 16, 18 e 20 de

preñez e nos dias 7, 14, 21 e 28 de lactação (Fig. 1). Ratas Wistar e SHR foram tratadas com o anti-hipertensivo atenolol na dose de 100mg/kg/dia por via oral, durante os períodos de prenhez (de 0 a 21 dias) e lactação (30 dias após o nascimento). O dia “zero” de prenhez foi identificado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (MONTES; LUQUE, 1988). A via oral foi selecionada para a administração do atenolol uma vez produzia o menor grau de stresse para ratas hipertensas.

O atenolol foi diluído em volume de água de beber, pré-determinado, a ser ingerido ao dia pelos animais. As ratas controles receberam o mesmo volume de água de beber sem a adição de atenolol.

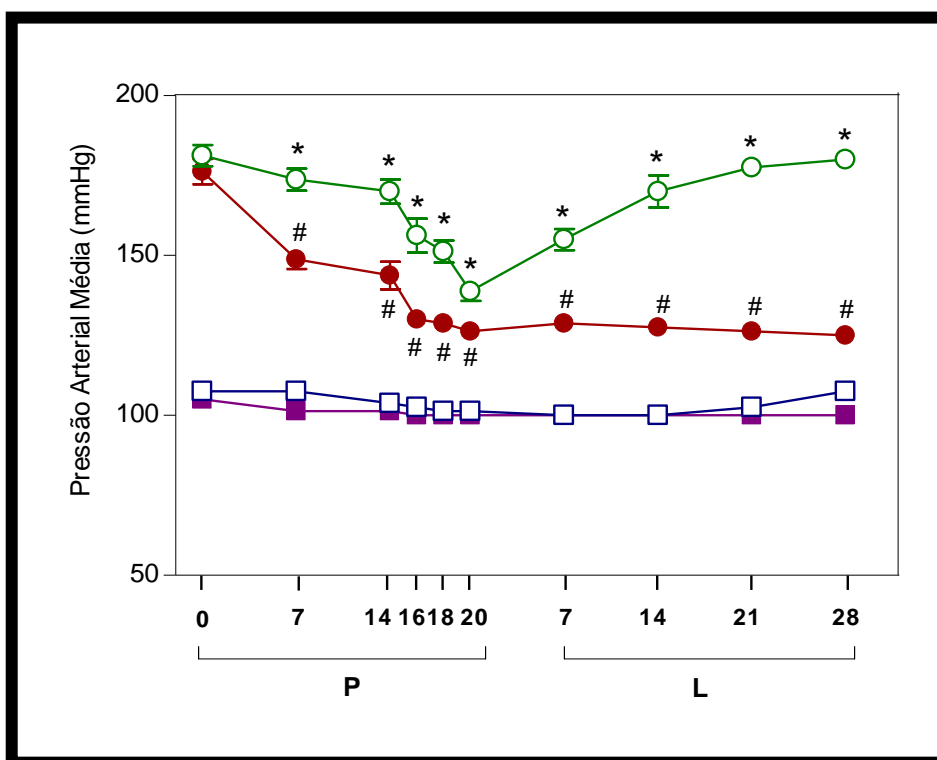


FIGURA 1: Ratas Wistar (□, n=10), SHR (○, n=10), Wistar tratadas (■, n=10) e SHR tratadas (●, n=10) com atenolol durante a prenhez (P) e lactação (L). Média ± SEM dos experimentos. *p<0.05 entre SHR e outros grupos. # p<0.05 entre SHR tratadas e outros grupos (ANOVA).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ratas foram divididas em grupos: ratas Wistar sem tratamento (n=5), ratas Wistar tratadas com Atenolol (n=5), ratas SHR sem tratamento (n=5), ratas SHR tratadas com Atenolol (n=5). Foram estudados dois filhotes machos (30 dias) de cada uma das ninhadas, perfazendo um total de dez filhotes por grupo experimental:

A) Filhotes machos de ratas Wistar não tratadas (fW, n=10), B) filhotes machos das ratas Wistar tratadas com Atenolol (fWA, n=10), C) filhotes machos de ratas SHR não tratadas (fSHR, n=10) e D) filhotes machos de ratas SHR tratadas com Atenolol (fSHRA, n=10).

3.5 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DE DENTES E OSSOS

Os filhotes das ratas controles e tratadas foram sacrificados aos 30 dias de vida e as seguintes peças anatômicas foram removidas: mandíbulas, tíbias e fêmures esquerdos e a 4^{as} vértebras lombares (L4). As peças retiradas dos animais foram dissecadas para a remoção dos tecidos moles e mantidas congeladas em solução fisiológica, em freezer a -70^oC, até o momento da análise radiográfica. A metodologia descrita por Silva et al. (2007) foi seguida para obtenção e análise das imagens radiográficas, sendo adaptadas para nossas condições experimentais.

Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 kvp, 10 mA, 12 pulsos. A distância foco-filme utilizada foi de 50 cm, com incidência perpendicular ao plano filme-objeto. A imagem digital direta foi obtida com a placa óptica do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Como referencial densitométrico nas tomadas radiográficas foi utilizada uma escada de alumínio (liga 6063, ABNT) de 9 degraus. Sobre cada placa óptica foram colocadas duas peças anatômicas (hemi-mandíbula e vértebra, tibia e fêmur), a escada e uma identificação com números de chumbo. Sobre a região central da placa óptica, alinhada mais para a esquerda, a hemi-mandíbula foi disposta com a face lingual voltada para baixo e com a incisal voltada para a esquerda. À direita foi colocada a L4, no sentido horizontal estando o corpo vertebral voltado para a região superior da placa. No canto superior esquerdo foi colocada a numeração e na região inferior foi disposta a escada de alumínio. Em outra placa foi disposto o fêmur na região central alinhado mais para a direita da placa óptica com a cabeça voltada para a direita. Na região superior ao fêmur foi colocada a tibia com a inserção distal da fíbula voltada para a esquerda e para a região inferior da placa óptica. No canto esquerdo foi disposta a numeração e na região inferior foi disposta a escala (Fig. 2). Foi obtida 1 imagem de cada uma das peças anatômicas por animal de cada grupo experimental (controles e tratados).

As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em escaner a laser do próprio equipamento Digora, e as imagens foram analisadas pelo software Digora for Windows 1.51. Este software possibilita, entre outros recursos, a determinação da densidade radiográfica (análise densitométrica), ou seja, a radiopacidade de um determinado objeto, através de seus níveis de cinza. Foram selecionadas áreas ou linhas de tamanho padronizado para leitura nas diferentes peças anatômicas. Foi delimitada uma área retangular no fêmur (80x14), tíbia (50x6), L4 (16x8) e nos degraus (26x70) e foi desenhada uma linha na crista óssea alveolar de 6 pixels no dente e de 14 pixels de comprimento (Fig. 1). O valor de densidade média foi utilizado para os cálculos necessários. Foram efetuadas 3 repetições de medidas em cada uma das áreas, em cada imagem e calculadas as médias dessas repetições, correspondendo à densidade radiográfica (DR) da área. O valor de DR foi convertido em milímetros de alumínio (mmAl) a partir de uma equação obtida no gráfico de dispersão relacionando os valores de radiopacidade de cada degrau de alumínio e sua espessura correspondente. Os valores em mmAl foram submetidos à análise estatística empregando o teste de multivariância (ANOVA) ou o teste t de Student para comparação entre os grupos experimentais.

3.6 ANÁLISE DO COMPRIMENTO E DA LARGURA DENTAL E ÓSSEA

Utilizando as mesmas imagens digitais e o software Digora foi realizada a análise do comprimento e da largura dental e óssea.

A largura do dente incisivo inferior foi medida na região da inserção óssea da face lingual. O comprimento do dente foi medido traçando uma linha da incisal até encontrar a linha feita para a medida da largura (Fig. 3F).

Na imagem horizontal do fêmur e da tíbia, a medida do comprimento foi feita traçando uma linha que unia as duas extremidades dos ossos em regiões que fossem possíveis de serem identificadas em todas as imagens. A medida da largura foi feita na metade do comprimento (Fig. 3C e D, respectivamente).

Na L4, disposta na posição horizontal, foi feita primeiramente a medida da largura, traçando uma linha que unia as duas extremidades em seus pontos mais proeminentes no sentido vertical. A medida do comprimento foi feita em seguida, traçando uma linha que une os dois pontos mais proeminentes no sentido horizontal, na altura da metade da largura (Fig. 3E).

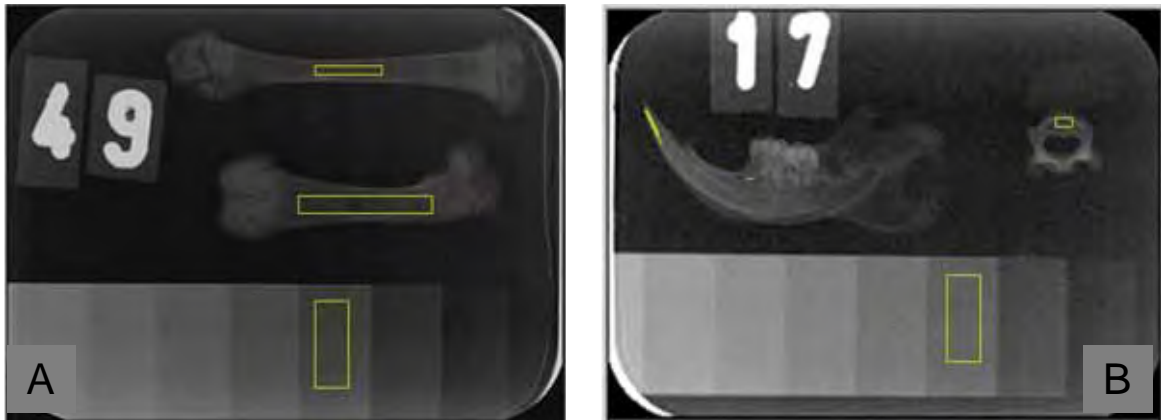


FIGURA 2: Análise da densidade radiográfica: A) regiões selecionadas no fêmur e na tíbia e B) regiões selecionadas no dente incisivo inferior, na crista óssea alveolar e na L4.

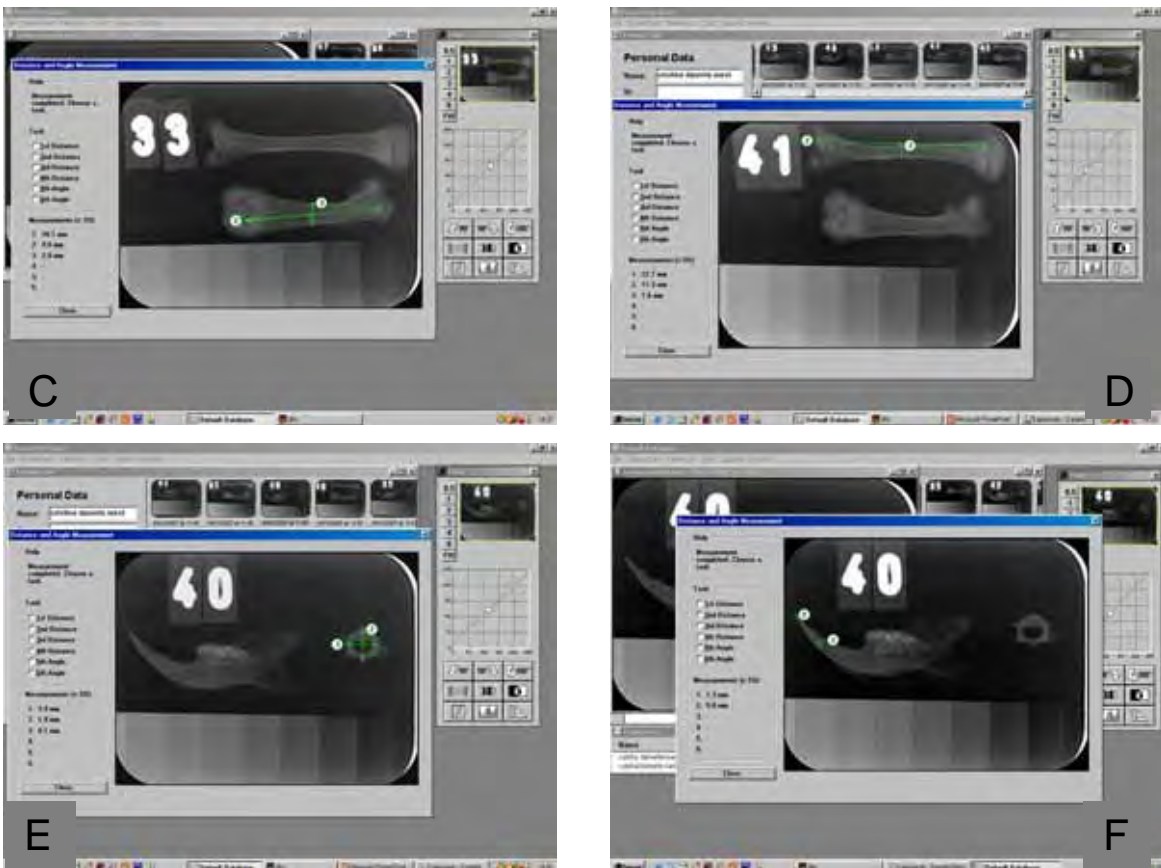


FIGURA 3: Medida de comprimento e largura ósseos e dental: A) medida do comprimento e largura do fêmur, B) medida do comprimento e largura da tíbia, C) medida do comprimento e largura da L4 e D) medida do comprimento e largura do dente incisivo.

3.7 TESTE DE MICRODUREZA DENTAL E ÓSSEA EM SECÇÃO LONGITUDINAL

Os dentes incisivos inferiores foram embebidos em resina acrílica através de embutidora AROTEC PRE-30S, de forma a permitir o polimento e teste de microdureza em secção longitudinal.

Os dentes incisivos inferiores foram removidos da hemi-mandíbula e embutidos com a face mesial voltada para a face superior do bloco (Fig. 4 A), ou seja, a face mesial foi colada com Super Bonder® na embutidora, juntos aos dentes foi colocado uma numeração, e a resina acrílica colocada sobre estes. Os fêmures e as tíbias tiveram suas epífises removidas, em seguida foram colados com Super Bonder® às formas utilizadas, estando posicionados com a mesial voltada para a parte direita do bloco (marcada) e a parte anterior voltada para a parte de cima do bloco. A L4 foi embutida na posição horizontal, estando o corpo da vértebra posicionado para a região central do bloco. Os três tecidos ósseos de cada animal foram embutidos juntos em um único bloco, ficando na seguinte seqüência: a vértebra na região superior do bloco, logo abaixo o fêmur, e abaixo deste a tíbia (Fig. 4 B). O desgaste foi realizado em secção longitudinal até ser exposta a parte média das peças, determinada a olho nu.

Para a inclusão dos dentes foi utilizado massa suficiente de resina acrílica transparente ($\pm 6g$) para o embutimento a quente POWER TRANSOPTIC™ BUEHLER® nº 20-3400-080 2,3Kg (41 Waukegan Rd.-Lake Bluff, IL 60044 USA), pressão de aproximadamente $125Kgf/cm^2$, aquecimento e resfriamento por 7 minutos. Para a inclusão dos ossos foi utilizada uma forma fabricada especialmente para estes experimentos, que permitisse a inclusão das peças de maneira diferente, pois os tecidos ósseos não suportariam a pressão exercida pela embutidora. Portanto, os ossos foram embutidos em resina acrílica transparente (a mesma utilizada para o embutimento dos dentes), na proporção pó/líquido de 1:1, utilizando-se uma forma de ferro com 6 orifícios com o mesmo diâmetro da embutidora. Após a manipulação da resina esta foi colocada sobre as peças previamente coladas às formas, de maneira a preencher todos os orifícios, foi inserida também uma numeração, e então, feita pressão manual com uma tampa de vidro contendo as mesmas medidas da forma utilizada. Logo em seguida a forma foi colocada em uma panela de pressão (60 mmHg), contendo água fervente, para a polimerização da resina, durante 20 minutos.

Na seqüência, os corpos de prova foram polidos em máquina para polimento APL-4 AROTEC utilizando-se 2 pesos, tempo de polimento de 5 minutos e refrigeração à água, para as lixas com granulações de 320, 600, 800 e 1200. Entre cada polimento, foi realizada limpeza dos corpos de provas em lavadora ultra-sônica BRANSON 2210R-MTH (BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner, BRANSON Ultrasonics Co.-41 Eagle ROAD, Danbury, CT. 06813, USA) e água deionizada (500ml para 40 corpos de provas) durante 2 minutos. O acabamento final foi obtido com pano de polimento (disco de feltro) TEXMET 1000, refrigerado com suspensão de $\frac{1}{4}$ de diamante à base de água (1 borrifada a cada 1 minuto) durante 5 minutos e 2 pesos. Em seguida, os corpos de prova foram lavados em lavadora ultra-sônica BRANSON 2210R-MTH (BRANSONIC® Ultrasonic Cleaner, BRANSON Ultrasonics Co.-41 Eagle ROAD, Danbury, CT. 06813, USA) utilizando água deionizada. A seguir os corpos de prova foram secos suavemente com papel. Para análise da microdureza em secção longitudinal (MDLS) foi utilizado o microdurômetro SHIMADZU MICRO HARDNESS TESTER HMV-2,000 (Shimadzu Co.- Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop (KHN), carga estática de 25 gramas para os dentes e 10 gramas para os ossos, e tempo de 10 segundos. As impressões foram visualizadas com auxílio de microscópio acoplado, com lente de aumento de 500 vezes. A análise da imagem foi feita pelo Software CAMS –WIN (New Age Industries, USA) acoplado ao microdurômetro.

Nos dentes foram realizadas 9 impressões no esmalte. A 200 μm da incisal no sentido horizontal, foram feitas 3 impressões no sentido vertical com distância de 20 μm entre elas, sendo a primeira a 20 μm da superfície externa do esmalte (20, 40 e 60 μm). Na seqüência, foram feitas mais 3 impressões com um intervalo de 500 μm no sentido horizontal, seguindo o mesmo padrão no sentido vertical, e finalmente, mais 3 marcas com intervalo de 500 μm no sentido horizontal seguindo o mesmo padrão no sentido vertical. Na dentina também foram realizadas 9 impressões seguindo a mesma seqüência descrita para o esmalte. O valor médio da microdureza do esmalte e da dentina de cada dente foi calculado através dos valores das 9 impressões obtidas em cada um destes tecidos (ver Fig 4 C e D). No fêmur e na tíbia foram feitas 18 impressões, sendo 9 na região cortical superior e 9 na região cortical inferior. Em cada cortical foram feitas três marcas na região central, sendo esta determinada a olho nu, com uma distância entre elas determinada de acordo com a espessura desta cortical, dividindo este valor da

espessura por 5, realizando portanto, 3 impressões eqüidistantes no sentido vertical. No sentido longitudinal foram feitas mais 3 marcas a 1000 μ m para a direita da região determinada como central, seguindo o mesmo padrão no sentido vertical, e mais 3 marcas a 1000 μ m para a esquerda da região central, seguindo novamente o mesmo padrão vertical. A microdureza média do fêmur e da tíbia foi obtida através dos valores das 18 impressões em cada uma destas peças (ver Fig. 4 E e F). Na L4 foram feitas 3 impressões aleatórias. Devido à grande porosidade da L4 não foi possível fazer as impressões em regiões padronizadas, desta maneira, as impressões foram feitas na região de melhor visualização do tecido ósseo. Com os valores das 3 impressões foi calculado a microdureza média.

O valor da microdureza em cada ponto medido foi determinado pela medida da distância entre as extremidades de cada impressão. Os valores de microdureza foram submetidos à análise estatística empregando o teste multivariância (ANOVA) para comparação entre os grupos experimentais.

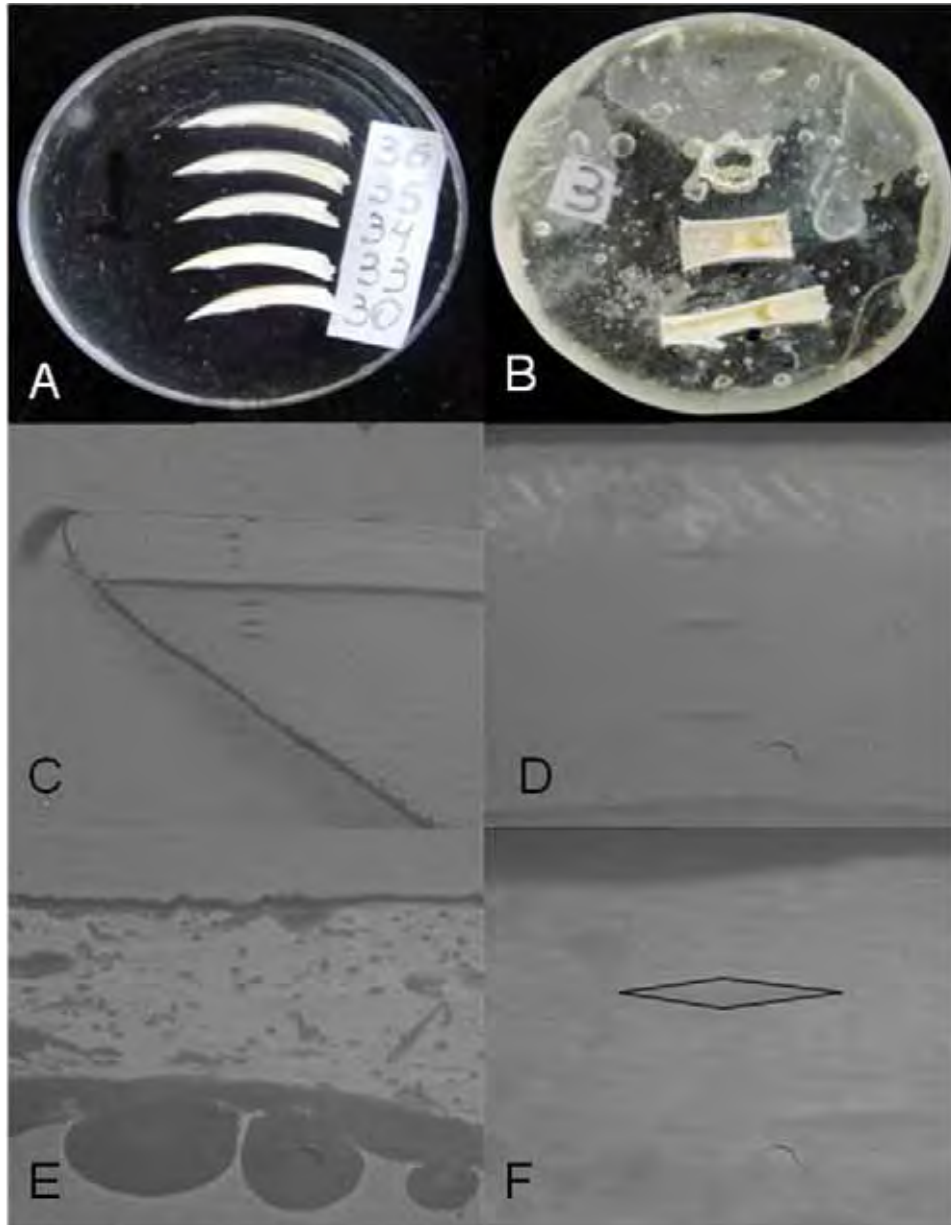


Figura 4: A e B Dentes e ossos (respectivamente) embutidos em resina acrílica para a análise da microdureza. C Visualização do dente incisivo com indentações em esmalte e dentina em aumento de 100x. D Visualização das indentações no esmalte em aumento de 500x. E Visualização da cortical óssea em aumento de 100x. F Visualização da indentação na cortical óssea em aumento de 500x.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo *software* Graph Pad 3.0. Inicialmente foi avaliada a homogeneidade entre os valores obtidos aplicando o teste de distribuição Gaussiana com 95% de confiabilidade. Aos grupos homogêneos foi aplicado o teste paramétrico ANOVA, com *post-test* de Tukey, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$. Para as variáveis que se apresentaram não homogêneas (teste de Bartlett) foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com *post-test* de Dunn, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Para uma análise mais criteriosa, alguns resultados foram também submetidos ao teste t de Student, não-pareado, comparando os grupos aos pares, e a diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), dos valores obtidos nos diferentes experimentos realizados.

A análise da DMO foi realizada para avaliarmos possíveis diferenças no conteúdo mineral de tecidos ósseos e dentais de ratos Wistar e SHR, e de possíveis alterações causadas nos mesmo tecidos pelo tratamento com atenolol.

Análise da Densidade Mineral Óssea

Como descrito anteriormente em materiais e métodos, os valores de DMO foram expressos em milímetros de Alumínio (mmAl).

Como podemos observar na fig. 5, filhotes de ratas SHR (fSHR) aos 30 dias de vida, apresentaram menor ($p < 0,05$) DMO do fêmur ($0,43 \pm 0,03$ mmAl) do que filhotes de ratas Wistar (fW, $0,63 \pm 0,04$ mmAl). Os filhotes de ratas Wistar tratadas com Atenolol (fWA, $0,47 \pm 0,04$ mmAl) apresentaram menor ($p < 0,05$) DMO do fêmur do que os fW ($0,63 \pm 0,04$ mmAl) não tratados. Não houve alteração significativa na DMO do fêmur dos fSHRA ($0,34 \pm 0,04$ mmAl) quando comparados aos fSHR ($0,43 \pm 0,03$ mmAl).

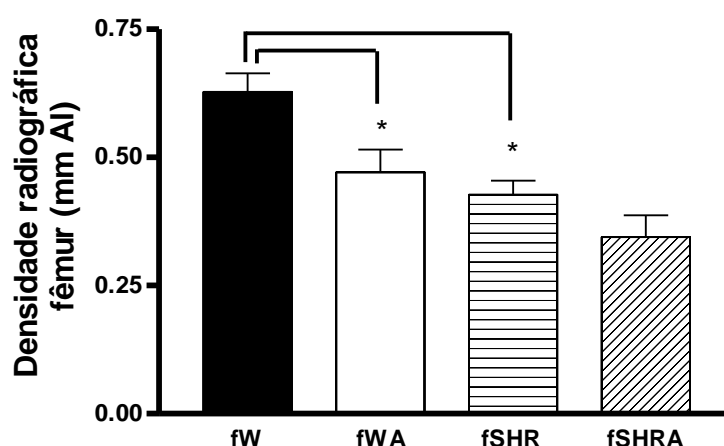


FIGURA 5: DMO do fêmur de filhotes de ratas Wistar (fW, $n=10$) e SHR (fSHR, $n=11$) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA, $n=10$, e fSHRA, $n=7$). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Tíbias de fSHR apresentam menor ($p < 0,05$) DMO que de fW ($0,77 \pm 0,05$ mmAl; $0,93 \pm 0,03$ mmAl, respectivamente). O tratamento com atenolol reduziu

($p < 0,05$) a DMO em fWA ($0,71 \pm 0,03$ mmAl) porém não alterou significativamente em fSHRA ($0,65 \pm 0,03$ mmAl) (Fig. 6).

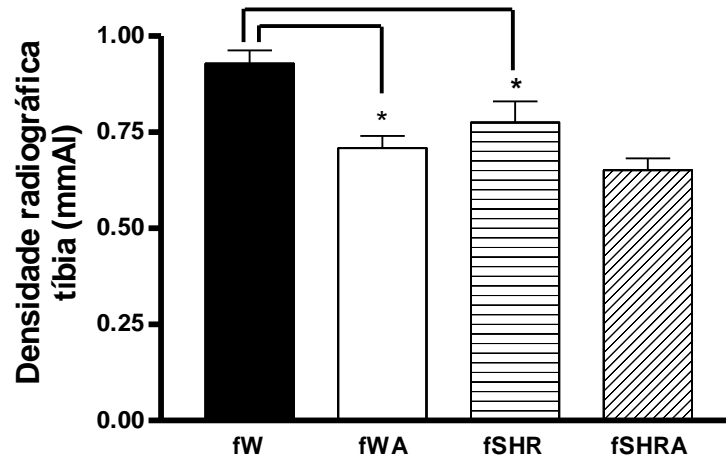


FIGURA 6: DMO da tíbia de filhotes de ratas Wistar (fW , n=10) e SHR (fSHR, n=12) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=10, e fSHRA, n=10). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (teste T de Student)

Na comparação da DMO da crista óssea alveolar entre os grupos (Fig. 7) observamos uma significativa redução destes valores em filhotes de ratas hipertensas (fSHR: $0,39 \pm 0,04$ e fW: $0,60 \pm 0,03$ mmAl). O tratamento com atenolol promoveu uma importante redução ($p < 0,05$) dos valores de DMO em fWA ($0,33 \pm 0,05$ mmAl), porém, não alterou significativamente em fSHRA ($0,45 \pm 0,04$ mmAl).

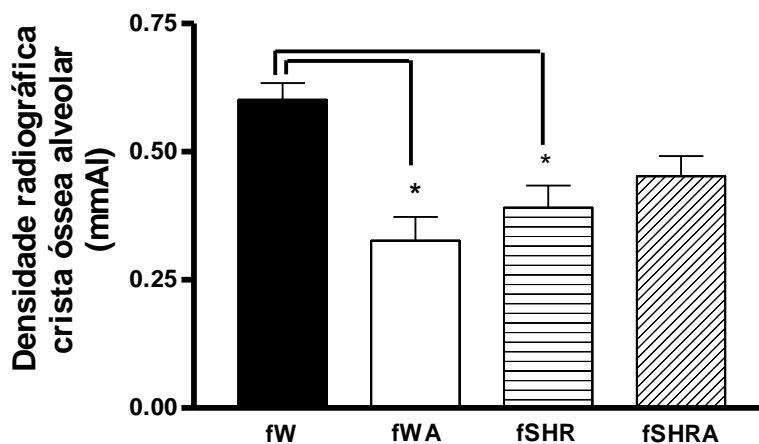


FIGURA 7: DMO da crista óssea alveolar de filhotes de ratas Wistar (fW , n=10) e SHR (fSHR, n=8) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=10, e fSHRA, n=8). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

A DMO da L4 de fSHR ($0,89 \pm 0,04$ mmAl) também foi menor ($p < 0,05$) do que fW ($1,14 \pm 0,04$ mmAl). Na L4 o efeito do tratamento com atenolol foi observado

apenas em Wistar (fWA: $0,97 \pm 0,05$ mmAl; fSHRA: $0,97 \pm 0,05$ mmAl; $p < 0,05$) (Fig. 8).

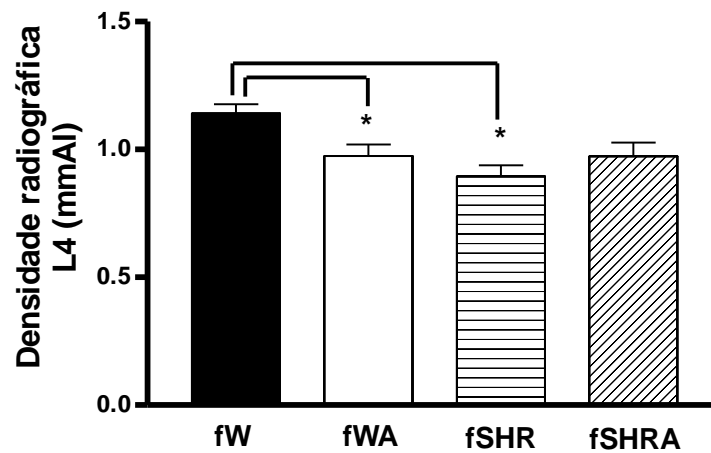


FIGURA 8: DMO da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratos Wistar (fW , n=10) e SHR (fSHR, n=9) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=10, e fSHRA, n=8). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Os tecidos dentais dos incisivos não apresentaram diferenças significativas de DMO entre ratos hipertensos e normotensos (fSHR: $1,08 \pm 0,07$; fW: $1,16 \pm 0,04$ mmAl). O tratamento com Atenolol não alterou os valores de DMO em fSHRA ($0,92 \pm 0,04$ mmAl), mas promoveu uma redução destes em fWA ($0,9034 \pm 0,04523$ mmAl; $p < 0,05$)(Fig. 9).

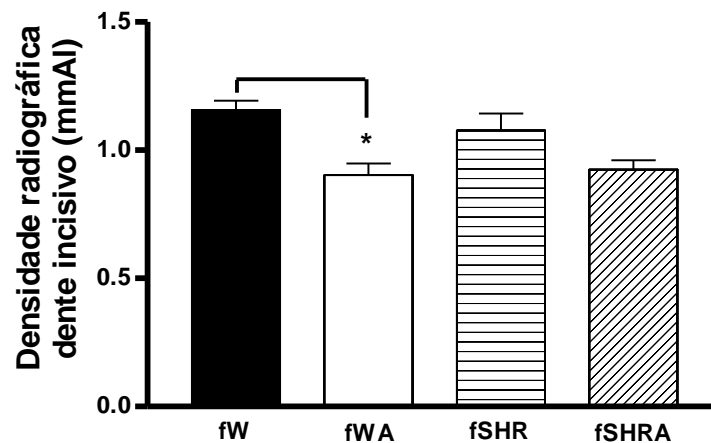


FIGURA 9: Densidade radiográfica do dente incisivo inferior de filhotes de ratos Wistar (fW , n=12) e SHR (fSHR, n=12) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=15, e fSHRA, n=10). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Os resultados em conjunto demonstraram que filhotes SHR apresentam menores DMO de fêmur, tíbia, crista óssea alveolar, L4, do que filhotes Wistar. Não houve diferença na DMO do dente incisivo entre os filhotes normotensos e hipertensos.

O tratamento de ratas Wistar com atenolol reduziu as DMO do fêmur, tibia, crista óssea alveolar, L4 e dente incisivo dos filhotes. No entanto, o tratamento com atenolol não alterou as DMO das peças anatômicas analisadas nos filhotes SHR.

Análise do Comprimento Ósseo e Dental

Como mostra a fig. 10, fSHR ($16,67 \pm 0,43$ mm) apresentaram menor ($p < 0,05$) comprimento do fêmur do que fW ($18,44 \pm 0,35$ mm). O tratamento com atenolol não causou alteração significativa no comprimento do fêmur em fWA ($17,71 \pm 0,21$ mm) todavia, diminuiu ($p < 0,05$) o mesmo em fSHRA ($15,71 \pm 0,54$ mm).

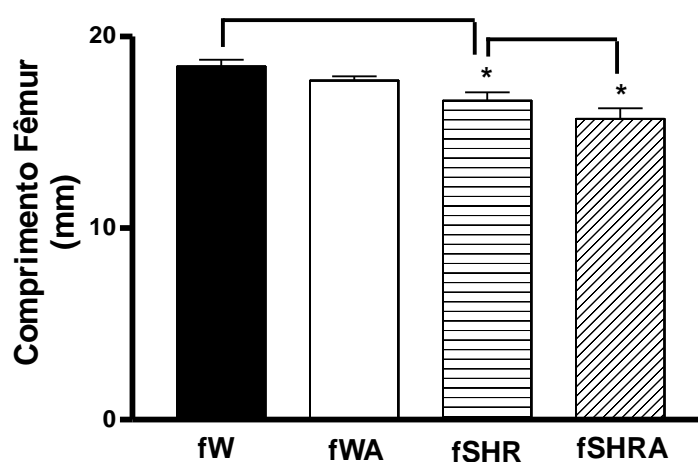


FIGURA 10: Comprimento do fêmur de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados ($n=9$). * $p < 0,05$ (teste T de Student)

Podemos observar a seguir, na fig. 11, que o comprimento da tibia foi menor ($p < 0,05$) em fSHR ($21,01 \pm 0,44$ mm) do que em fW ($23,99 \pm 0,30$ mm). Em fWA ($22,81 \pm 0,22$ mm) o tratamento com atenolol diminuiu ($p < 0,05$) o comprimento da tibia, porém não causou alteração significativa em fSHRA ($20,11 \pm 0,45$ mm), em relação a seus respectivos grupos controle.

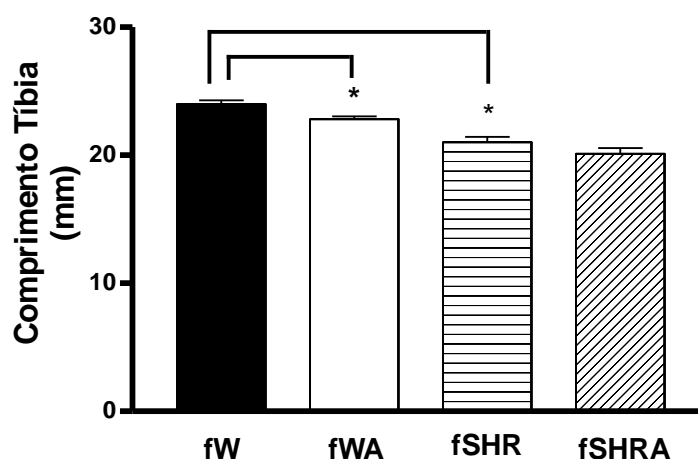


FIGURA 11: Comprimento da tíbia de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=10). * $p < 0,05$ (teste T de Student).

Quando analisado o comprimento da L4 (Fig. 12), este foi menor ($p < 0,05$) em fSHR ($4,12 \pm 0,03$ mm) do que em fW ($4,42 \pm 0,03$ mm). Na L4 também observamos que o tratamento com atenolol diminuiu ($p < 0,05$) seu comprimento em fWA ($4,15 \pm 0,03$ mm), mas não alterou significativamente em fSHRA ($4,10 \pm 0,05$ mm).

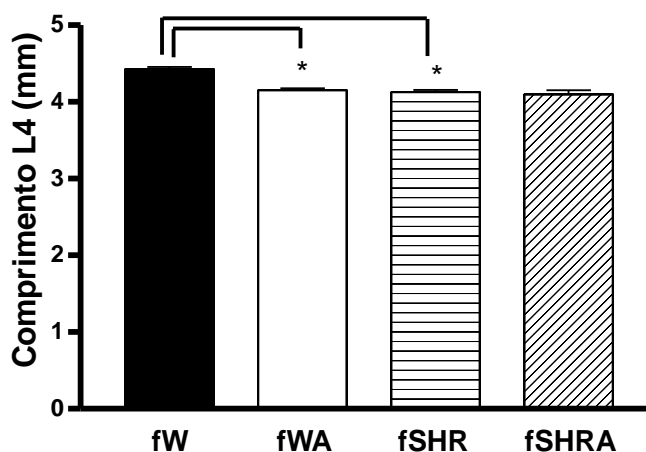


FIGURA 12: Comprimento da L4 de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=10). * $p < 0,05$ (ANOVA).

Como podemos observar na fig. 13, o comprimento do dente incisivo de fSHR ($3,85 \pm 0,07$ mm) foi menor ($p < 0,05$) do que em fW ($4,65 \pm 0,09$ mm). O tratamento com atenolol diminuiu ($p < 0,05$) o comprimento do dente incisivo em fWA ($4,38 \pm 0,07$ mm) contudo, não alterou significativamente em fSHRA ($3,72 \pm 0,12$ mm).

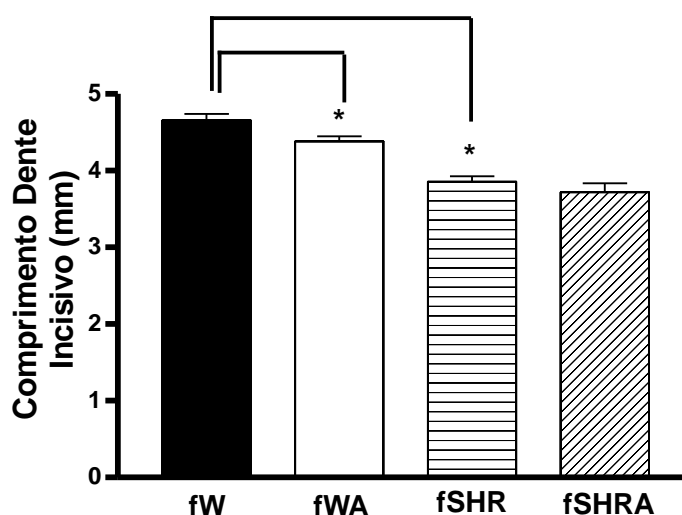


FIGURA 13: Comprimento do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=11). * $p < 0,05$ (teste T de Student).

Analisando os resultados do comprimento ósseo e dental, podemos observar que fSHR apresentaram menor comprimento do fêmur, tíbia, L4 e dente incisivo inferior quando comparados aos fW. Em SHR, o tratamento com atenolol reduziu apenas o comprimento do fêmur, no entanto, em filhotes Wistar, o atenolol diminuiu o comprimento da tíbia, L4 e dente incisivo inferior

Análise da largura óssea e dental

Não houve diferença significativa entre a largura do fêmur (Fig. 14) de fSHR e fW ($2,46 \pm 0,09$ e $2,61 \pm 0,04$ mm, respectivamente). Uma redução ($p < 0,05$) na largura do fêmur foi observada em fWA ($2,36 \pm 0,04$ mm) no entanto, não houve alteração significativa da mesma em fSHRA ($2,26 \pm 0,08$ mm).

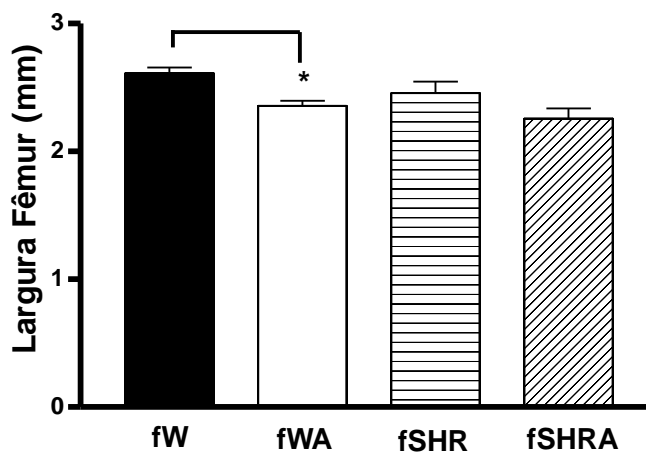
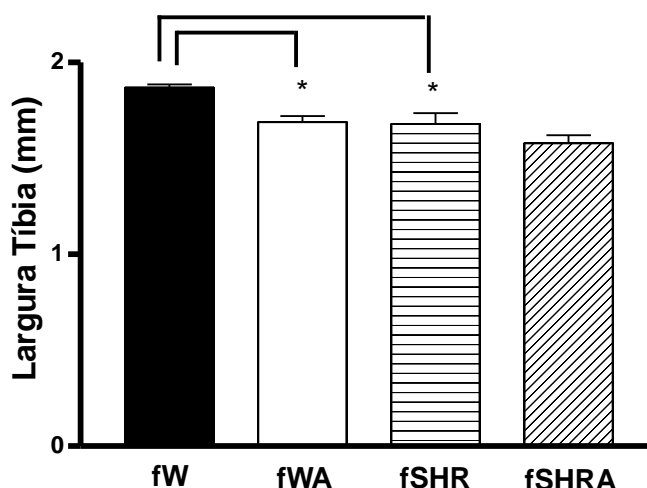


FIGURA 14: Largura do fêmur de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=9). * $p < 0,05$ (teste T de Student).

Ao avaliarmos os resultados obtidos da largura da tíbia de fW, a análise estatística demonstrou que não havia normalidade entre os valores e que as variâncias diferiam significativamente. Como optamos por não fazer transformação de dados, os resultados obtidos foram comparados entre todos os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, que compara os valores de mediana. Por sugestão de estatístico consultado na realização deste teste é importante os valores de mediana, assim, na figura 11 foram incluídos o gráfico que representa os valores da média \pm EPM dos resultados obtidos e os respectivos valores de mediana.

A largura da tíbia de fSHR ($1,68 \pm 0,05$ mm) foi menor ($p < 0,05$) do que de fW ($1,87 \pm 0,01$ mm) e não diferiu significativamente de fSHRA ($1,58 \pm 0,04$ mm). O tratamento com atenolol diminuiu ($p < 0,05$) a largura da tíbia em fWA ($1,69 \pm 0,03$ mm) quando comparados aos fW (Fig. 15).



GRUPO	fW	fWA	fSHR	fSHRA
MEDIANA	1.90	1.65	1.70	1.60

FIGURA 15: Largura da tíbia de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=10). * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis).

Na fig. 16, podemos observar que fSHR ($4,16 \pm 0,11$ mm) apresentaram menor ($p < 0,05$) largura da L4 do que fW ($4,75 \pm 0,07$ mm). Na L4 o atenolol reduziu a largura apenas em filhotes Wistar (fWA: $4,21 \pm 0,05$ mm; fSHRA: $3,89 \pm 0,13$ mm; $p < 0,05$).

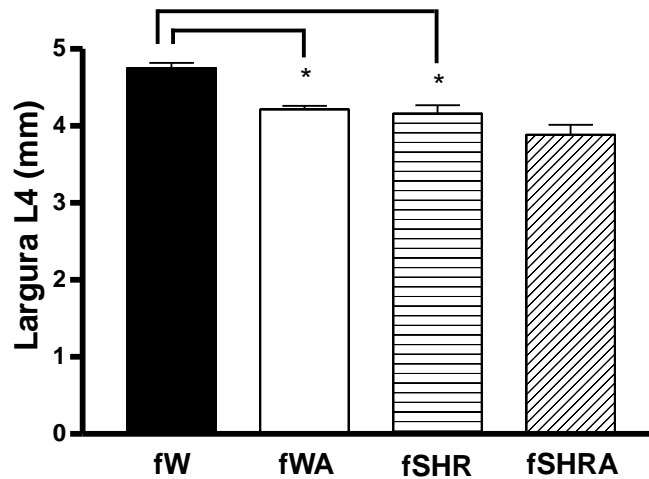


FIGURA 16: Largura da quarta vértebra lombar (L4) de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=8). * $p < 0,05$ (ANOVA).

A largura do dente incisivo de fSHR ($1,36 \pm 0,03$ mm) e fW ($1,41 \pm 0,02$ mm) é semelhante. O atenolol diminuiu ($p < 0,05$) a largura do dente incisivo tanto em fWA ($1,32 \pm 0,02$ mm) quanto em fSHRA ($1,28 \pm 0,03$ mm) (Fig. 17).

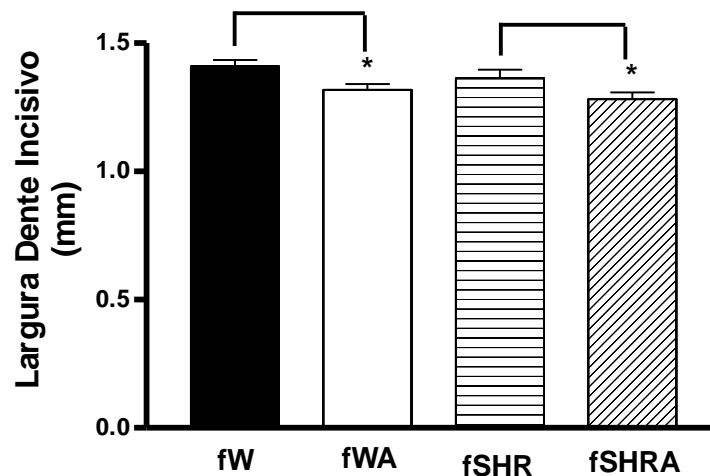


FIGURA 17: Largura do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar (fW) e SHR (fSHR) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA e fSHRA). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (n=11). * $p < 0,05$ (teste T de Student).

Os resultados da análise da largura óssea e dental, em conjunto, demonstraram que fSHR apresentam menor largura da tíbia e L4 do que fW, e ainda, que o atenolol diminuiu a largura do fêmur, tíbia, L4 e dente incisivo de fWA, já em fSHRA, diminuiu somente a largura do dente incisivo, quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

Análise da microdureza óssea e dental

Na fig. 18 podemos observar que não houve diferença significativa na microdureza do fêmur entre fSHR ($21,99 \pm 1,02$), fW ($24,47 \pm 1,03$) e fWA ($24,80 \pm 0,72$). No entanto, a microdureza do fêmur de fSHRA ($17,25 \pm 1,273$) foi menor ($p < 0,05$) quando comparada com seu respectivo controle.

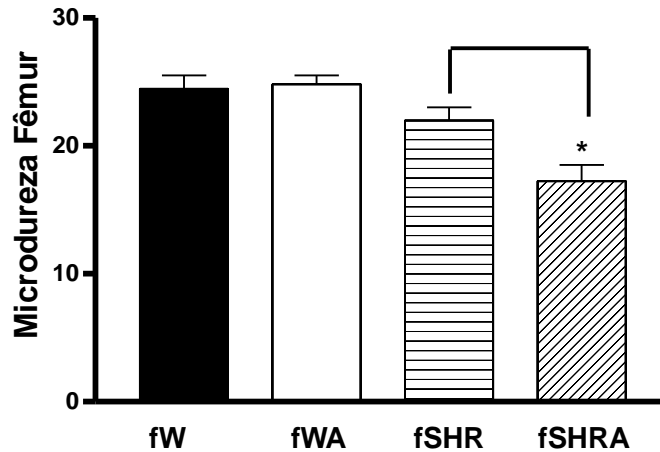


FIGURA 18: Microdureza do fêmur de filhotes de ratas Wistar (fW , n=13) e SHR (fSHR, n=12) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=15, e fSHRA, n=8). As barras representam a média ± EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Na comparação dos grupos observamos que não houve diferença significativa na microdureza da tíbia entre ratos normotensos e hipertensos tratados ou não com atenolol (fW: $24,61 \pm 0,63$; fSHR: $22,77 \pm 0,90$; fWA: $26,65 \pm 0,88$; fSHRA: $23,97 \pm 0,68$) (Fig. 19) .

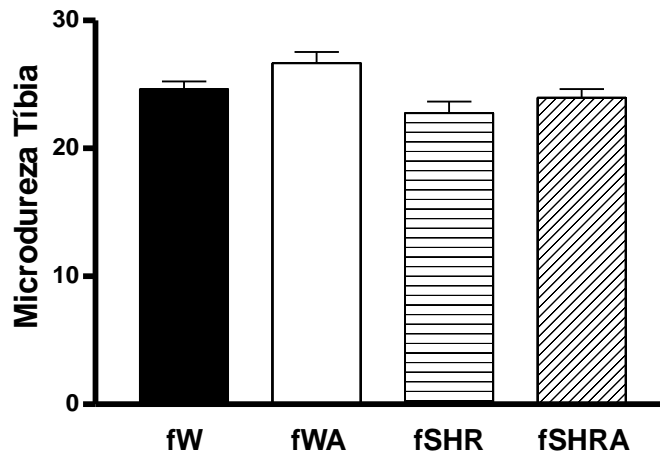


FIGURA 19: Microdureza da tíbia de filhotes de ratas Wistar (fW , n=12) e SHR (fSHR, n=12) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=13 e fSHRA, n=10). As barras representam a média ± EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

A microdureza da L4 não foi significativamente diferente entre os grupos normotensos e hipertensos não tratados e tratados com atenolol (fW: $55,87 \pm 2,87$; fSHR: $60,23 \pm 1,73$; fWA: $62,72 \pm 2,75$; fSHRA: $64,69 \pm 2,22$) (Fig. 20) .

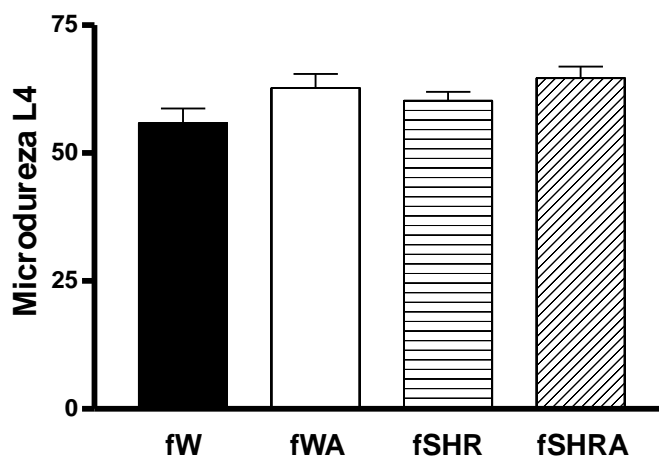


FIGURA 20: Microdureza da L4 de filhotes de ratas Wistar (fW , n=13) e SHR (fSHR, n=10) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=15 e fSHRA, n=6). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Não houve diferença significativa entre a microdureza de esmalte do dente incisivo de fSHR($310,2 \pm 6,72$) e fW ($312,8 \pm 3,10$). O atenolol não alterou a microdureza de esmalte do dente incisivo em fWA ($339,1 \pm 11,97$),no entanto, causou aumento ($p < 0,05$) da mesma em fSHRA ($276,5 \pm 8,54$), quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Fig. 21).

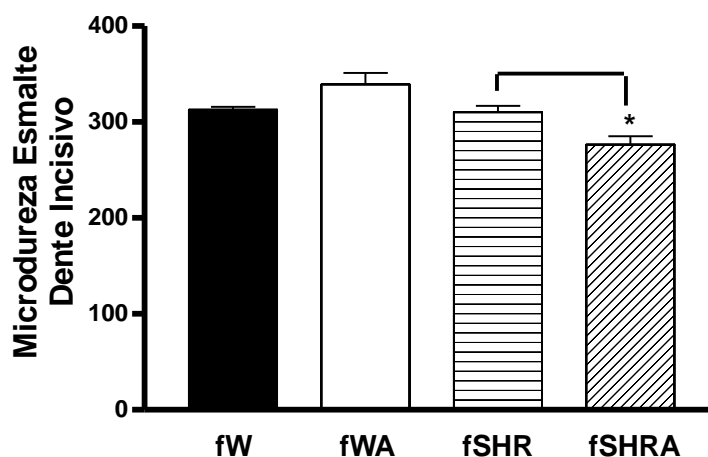


FIGURA 21: Microdureza de esmalte do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar (fW , n=10) e SHR (fSHR, n=9) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=8 e fSHRA, n=8). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (teste T de Student).

A microdureza da dentina do dente incisivo de fSHR ($47,25 \pm 1,08$) foi maior ($p < 0,05$) quando comparada a de fW ($44,48 \pm 0,29$).O atenolol não alterou a microdureza de dentina em fWA ($45,90 \pm 0,96$) quando comparados aos fW, assim como também não alterou em fSHRA ($48,90 \pm 0,51$) em relação aos fSHR (Fig. 22).

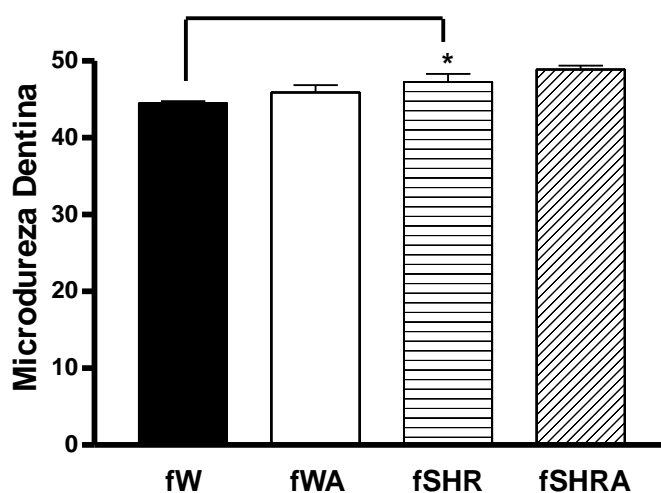


FIGURA 22: Microdureza de dentina do dente incisivo inferior de filhotes de ratas Wistar (fW , n=13) e SHR (fSHR, n=11) sem tratamento e tratadas com Atenolol (fWA,n=15 e fSHRA, n=11). As barras representam a média ± EPM dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ (teste T pareado).

Os resultados da análise da microdureza óssea e dental demonstraram que fSHR apresentaram maior microdureza da dentina do dente incisivo inferior, e que não houve diferença na microdureza óssea, quando comparados aos fW. O atenolol diminuiu a microdureza do fêmur e do esmalte em fSHRA, porém, não alterou a microdureza dos tecidos ósseos e dentais em fWA.

5 Discussão

5 Discussão

O conteúdo mineral em ossos, mas não em dentes, está alterado em SHR.

Neste estudo demonstramos pela primeira vez que SHR, aos 30 dias, apresentam menor DMO do fêmur, tíbia, crista óssea alveolar e L4, mas não apresentam alteração na DMO do dente incisivo inferior. Uma vez que a análise da DMO mede basicamente o conteúdo mineral e que ossos e dentes são compostos, em sua maior parte, por uma matriz inorgânica de cristais de hidroxiapatita (67% em ossos, 96-98% em esmalte e 70% em dentina), estes resultados sugerem que SHR em idade pré-hipertensiva apresentariam menor quantidade de mineral nos tecidos ósseos, sem alteração dos tecidos dentais.

Na literatura são encontrados muitos estudos que avaliaram a DMO de tecidos de ratos SHR em diferentes idades. Lucas et al. (1986) demonstraram que fêmures de ratos SHR com 23 semanas apresentam menor densidade óssea (expressa pela média do conteúdo mineral por espessura do fêmur) e com 31 semanas, menor conteúdo de cálcio (mg de Ca/g de cinzas). Naito et al. (1993) demonstraram que a DMO do fêmur de SHRSP (Stroke-Prone) com idade de 6 a 36 semanas está diminuída em relação aos ratos normotensos. Inoue et al. (1995) demonstraram que ratos SHR machos e fêmeas apresentam menor DMO na região proximal da tíbia (rica em osso trabecular), mas não na região central (rica em osso cortical), quando comparados aos ratos Sprague-Dawley. As alterações observadas foram encontradas tanto em SHR velhos quanto em jovens (6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 e 60 semanas). Estas alterações poderiam estar associadas a uma significativa diminuição na espessura trabecular, no número de trabéculas, na formação óssea e no aumento da separação trabecular em tíbia e fíbula observado em SHR com 25 semanas. O perímetro (calceína marcado) e porcentagem de superfície das trabéculas da metáfise também estão significativamente diminuídos em SHR (WANG et al., 1993).

Neste estudo demonstramos que a DMO de dentes incisivos de SHR não estava alterada ao ser comparada com de ratos controles. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a DMO em dentes de animais hipertensos. Em nossos estudos demonstramos que as alterações são específicas de tecidos ósseos, incluindo osso alveolar e que não afetam tecido dental. O presente estudo foi um

entre os primeiros a demonstrar que estas alterações podem ser observadas já na fase pré-hipertensiva em SHR.

Em humanos a hipertensão arterial essencial tem sido correlacionada com a diminuição da DMO, no entanto, resultados controversos são encontrados na literatura. Goto et al. (1995) demonstraram que algumas patologias ósseas são agravadas em hipertensos devido ao metabolismo de cálcio alterado nestes indivíduos. Afghani e Goran (2007) demonstraram que adolescentes latinos, de ambos os sexos, com sobrepeso e hipertensos apresentam menor conteúdo mineral ósseo corporal total e que a pressão arterial sistólica está inversamente correlacionada com o conteúdo mineral ósseo em adolescentes do sexo masculino pós-adolescência com sobrepeso. Em contraste, Pludowski et al. (2008) observaram que, independentemente do gênero, crianças e adolescentes hipertensos apresentaram valores de conteúdo mineral ósseo corporal total e DMO corporal total dentro dos parâmetros fisiológicos para suas idades. Pérez-Castrillón et al. (2003) não encontraram relação entre hipertensão e DMO em mulheres pós-menopausa. No entanto, demonstraram que um aumento na calciúria estaria associado com uma diminuição na DMO em mulheres hipertensas.

Tem sido demonstrado que SHR apresentam várias anormalidades no metabolismo do cálcio, podendo ser esta uma das possíveis explicações para as alterações ósseas encontradas. As anormalidades incluem elevação do paratormônio (PTH) no plasma (KOTCHEN et al., 1989; MCCARRON et al., 1981; MERKE et al., 1989), aumento da calcitonina plasmática (BINDELS et al., 1987), aumento na excreção urinária de cálcio (BINDELS et al., 1984 apud BINDELS et al., 1987; LAU et al., 1986; MCCARRON et al., 1981; SCHEDL et al., 1986), diminuição na absorção de cálcio (LUCAS et al., 1986; SCHEDL et al., 1986), discreta diminuição do cálcio plasmático ionizado (MCCARRON et al., 1981, 1982; WRIGHT et al., 1980; WRIGHT e RANKIN, 1982), hipofosfatúria em combinação com hipofosfatemia (BINDELS et al., 1986; BLOOMQUIST et al., 1983; MCCARRON, 1982; HSU et al., 1984), alterações na concentração plasmática de metabólitos da vitamina D $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BINDELS et al., 1987; LUCAS et al., 1986) e diminuição dos níveis circulatórios de calcitriol (MERKE et al., 1989), os quais também participam do metabolismo do cálcio. Em conjunto, todos os resultados sugerem alterações importantes no metabolismo do cálcio e/ou no conteúdo mineral ósseo em SHR.

Outra possível explicação para a diminuição da DMO em SHR, seria o *turnover* ósseo aumentado (WRIGHT e DEMOSS, 2000), evidenciado pela maior taxa de reabsorção óssea em todo o esqueleto de SHR com 8 e 24 semanas. Wang et al. (1993) sugerem que as alterações esqueléticas encontradas em SHR ocorreriam como resultado de um aumento da reabsorção óssea, pois somente um aumento desta poderia causar uma diminuição na massa de osso medular, no número e espessura trabecular e no aumento da separação trabecular, uma vez que a diminuição da formação óssea levaria à redução do osso medular e da espessura trabecular. Ainda, sugerem que a histomorfometria óssea do SHR melhor se encaixa no modelo de adaptação esquelética à baixa carga, uma vez que ratos SHR apresentam menor massa corporal.

Em nosso estudo verificamos que SHR apresentam menores comprimentos de fêmur e de L4, sem alteração em suas larguras, e menor comprimento e largura da tíbia. Nossos resultados corroboram os de Bindels et al. (1987) que demonstraram que filhotes SHR com 6 semanas apresentam menor comprimento fêmur, porém com maior volume (em cm³). Wang et al. (1993) demonstraram que ratos SHR com 25 semanas apresentam redução significativa na taxa de crescimento longitudinal e menor espessura da placa de crescimento da tíbia. Estes resultados sugerem que as alterações nos mecanismos de formação e/ou desenvolvimento dos tecidos ósseos ocorrem em SHR e não estariam diretamente associados à hipertensão uma vez que foram observados também em idade pré-hipertensiva.

Acontecendo em idade pré-hipertensiva estas alterações poderiam estar associadas diretamente ao genótipo do rato, ou à hipertensão materna. Wlodek et al. (2003) observaram que ratos SHR aos 14 dias de vida são menores do que ratos Wistar, devido à restrição de crescimento intra-uterino como conseqüência da hipertensão materna, restrição esta que pode ser constatada clinicamente em humanos, filhos de mães hipertensas. A restrição de crescimento intra-uterino em SHR seria conseqüente da diminuição no fluxo sanguíneo para a placenta e no transporte de nutrientes para o feto, resultando em redução do peso fetal. No mesmo estudo, demonstraram que o crescimento pós-natal de SHR seria prejudicado pela nutrição através do leite materno. Ratas SHR produzem menos leite devido a uma deficiência no desenvolvimento das glândulas mamárias (GOULDSBOROUGH et al., 1998 apud WLODEK et al., 2003; WLODEK et al.,

2003). O leite materno é a única fonte de cálcio para o recém nascido e uma deficiência na lactação poderia causar um grande impacto na homeostase do cálcio e no crescimento ósseo. No leite de SHR foram observadas menores concentrações de proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP) e menor concentração de cálcio. Defeitos na homeostase do cálcio e nos níveis celulares de cálcio estão associados com restrição de crescimento assim como com a hipertensão (PITKIN, 1975 apud WLODEK et al., 2003). O PTHrP presente no leite promove o crescimento, a maturação do intestino e o transporte de cálcio através das paredes intestinais no recém-nascido (KOVACS e KRONENBERG, 1997 apud WLODEK et al., 2003,). Wlodek et al. (2003) também sugerem que o PTHrP presente no leite materno é um modulador significativo do crescimento e desenvolvimento pós-natal.

Neste estudo demonstramos que ratos SHR apresentam menor comprimento do dente incisivo inferior sem alteração na sua largura, resultados sugestivos de alteração no processo de erupção dental. Shimada (2004) observaram que em modelo experimental de hipertensão induzida por infusão de angiotensina II, ocorre uma diminuição da microcirculação na base do dente incisivo inferior (incluindo ligamento periodontal e polpa) e uma diminuição no seu movimento eruptivo. Uma redução no número de arteríolas e capilares, um fenômeno conhecido como rarefação, são os achados mais consistentes na hipertensão humana e animal (LE NOBLE et al., 1998). Como foi demonstrado, em ratos SHR muito jovens há uma diminuição na densidade arteriolar e capilar (LE NOBLE et al., 1990 apud WANG et al., 2004) e esta poderia estar associada à menor erupção dental observada. Foi demonstrado também que o PTHrP é um fator auto/parácrino no desenvolvimento dos órgãos e dentre eles, no desenvolvimento dental. Calvi et al. (2004) sugeriram que a ativação do receptor de PTH/PTHrP tem um papel importante na citodifenciação de odontoblastos e ameloblastos e assim na morfogênese dental. Este mecanismo poderia estar associado ao menor comprimento do dente incisivo em SHR, uma vez que foi demonstrado por Wlodek et al. (2003) que ratas SHR apresentam menor concentração do peptídeo (PTHrP) no leite materno e no plasma. Na revisão de literatura de Boggio et al. (2004) foi citado que o sistema nervoso autônomo seria um dos fatores que modificam a erupção dental, uma vez que a denervação simpática altera o crescimento dental. No entanto, os dados na literatura não são conclusivos, pois o efeito estimulatório da denervação simpática na taxa de

erupção do incisivo de roedores é observado somente quando em infra-oclusão, ocorrendo efeito contrário quando o dente recebe o stress da oclusão.

A partir dos resultados obtidos nesta primeira parte do estudo, concluímos que SHR aos 30 dias apresentam alterações de formação óssea e dental bastante significativas se comparados aos ratos normotensos. As alterações observadas ocorrem em tecido ósseo apendicular (fêmur e tibia) e axial (vértebra L4) sugerindo que estas alterações não estariam correlacionadas com o menor peso corporal de SHR.

SHR e Wistar apresentam microdureza do fêmur, tibia, L4 e esmalte semelhante, enquanto que a microdureza da dentina é maior em SHR do que em Wistar.

A fim de avaliarmos se, assim como ocorrem alterações na DMO, no comprimento e largura de ossos e dentes em SHR, ocorreriam também alterações na dureza destes tecidos, foi realizado o teste de microdureza nas diferentes peças anatômicas estudadas.

Embora SHR tenham apresentado menor densidade radiográfica do fêmur, tibia, e L4 estas mesmas estruturas não apresentaram alteração de microdureza quando comparadas aos ratos Wistar.

No dente incisivo não podemos correlacionar a microdureza do esmalte e da dentina com a DMO do dente uma vez que na análise da DMO não foi feita distinção entre estas estruturas, já a análise da microdureza foi feita separadamente para o esmalte e a dentina.

A análise da DMO avalia possíveis alterações no conteúdo mineral do tecido, porém, não nos possibilita distinguir a que nível ocorre estas alterações. Estas alterações podem ser resultado tanto de uma deficiência de mineralização quanto de uma alteração na microestrutura do tecido, como por exemplo, menor número de trabéculas ou aumento da separação entre as trabéculas.

Lane et al. (2003) observaram alterações na microarquitetura óssea da metáfise tibial de ratos osteopênicos (alterações estas que refletiriam na DMO do mesmo tecido), que foram tratados ou não com PTH humano ou bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos), no entanto, não observaram alteração da dureza quando foram realizadas nanoindentações nas mesmas, um outro método (*"Vickers indenter"*) de se medir a dureza de um material. Sheng et al. (2006) demonstraram que a deficiência de estrógeno causada por ovariectomia em ratas promove

significativas alterações osteoporóticas na vértebra, incluindo redução na DMO, no entanto, não altera as propriedades nanomecânicas das trabéculas, sugerindo que não haveria correlação entre a DMO e a dureza de um determinado tecido. Boivin et al. (2008) foram os primeiros a demonstrar correlação positiva entre microdureza e o grau de mineralização óssea no osso ilíaco de homens e mulheres saudáveis e/ou com osteoporose. Demonstraram, ainda, que a matriz orgânica é responsável por aproximadamente 1/3 da dureza do tecido ósseo.

O atenolol altera a formação e/ou desenvolvimento de tecidos ósseos e dentais.

A fim de avaliarmos se estas alterações poderiam estar associadas a um possível efeito da hipertensão materna sobre os processos de formação e/ou desenvolvimento do tecido mineralizado, as ratas foram tratadas com atenolol, um anti-hipertensivo utilizado na clínica médica, durante os períodos de prenhez e lactação. Estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que o atenolol não altera a pressão arterial de ratas normotensas, mas é eficaz como anti-hipertensivo em ratas SHR durante os períodos de prenhez e lactação (ELIAS et al., 2008).

Testamos a hipótese de que as alterações observadas em SHR de 30 dias, pré-hipertensos, seriam conseqüentes da hipertensão materna. Assim ao reduzirmos a pressão arterial das ratas SHR durante a prenhez e lactação, alterações de tecidos ósseos e dentais não deveriam ser mais observadas nos filhotes. Porém, para avaliarmos se o atenolol teria um efeito (direto) sobre a formação/desenvolvimento dos tecidos analisados, independentemente do efeito sobre a pressão arterial, realizamos o mesmo tratamento em ratas Wistar e comparamos os efeitos observados nos filhotes. O tratamento das ratas SHR com atenolol não alterou a DMO das peças anatômicas analisadas em filhotes SHR. Porém, diminuiu o comprimento do fêmur, a largura do dente incisivo, a microdureza do fêmur e a microdureza do esmalte. O tratamento das ratas Wistar com atenolol diminuiu a DMO do fêmur, tíbia, crista óssea alveolar, 4^a vértebra lombar e do dente incisivo nos filhotes. Diminuiu também o comprimento e a largura da tíbia, comprimento e largura da L4, comprimento e largura do dente incisivo inferior, a largura do fêmur, todavia, o atenolol não alterou a microdureza dos tecidos ósseos e dentais em filhotes Wistar. Os resultados obtidos sugerem que o atenolol teria efeito direto sobre a formação e ou desenvolvimento de tecidos mineralizados.

Os efeitos do atenolol em filhotes Wistar seriam mais evidentes do que em SHR uma vez que ratos Wistar não apresentariam alterações de formação ou desenvolvimento dos tecidos como as observadas em SHR antes do tratamento. As alterações pré-existentes em SHR poderiam modular o efeito do atenolol nestes animais.

Nossos resultados reforçam as avaliações clínicas prévias que demonstraram que mulheres tratadas com atenolol desde os períodos iniciais de gestação (antes de 20 semanas), tiveram filhos mais leves, menores em comprimento do que aquelas que foram tratadas com atenolol depois da 30ª semana de gestação e fetos com retardo do crescimento intra-uterino (EASTERLING et al., 2001; LIP et al., 1997; MAGEE et al., 1999) quando comparadas àquelas que foram tratadas com outros tipos de anti-hipertensivos ou com medicamentos placebo.

A toxicidade do atenolol no período pré-natal tem sido demonstrada por alterações placentárias, retardo de crescimento fetal intra-uterino, redução do peso fetal e ao nascimento, com ausência de má-formações congênitas, e efeito pós-natal como redução de ganho de peso, similares em diferentes espécies animais (ratos e coelhos) e em humanos (TABACOVA et al., 2003), entretanto, pouca atenção foi direcionada para examinar se o tratamento com atenolol durante a organogênese poderia afetar os tecidos mineralizados. Demonstramos, pela primeira vez, que o atenolol altera a formação e/ou desenvolvimento de tecidos mineralizados de filhotes de ratas tratadas.

A partir destes resultados poderíamos sugerir que receptores β_1 -adrenérgicos, antagonizados pelo atenolol, participariam da formação (organogênese) e/ou desenvolvimento de tecidos mineralizados (osso e dente). Vários mecanismos poderiam estar envolvidos no efeito do atenolol observado sobre os tecidos mineralizados de filhotes de ratas Wistar e SHR tratadas.

Estudos recentes têm demonstrado que antagonistas β -adrenérgicos podem alterar o metabolismo ósseo, processo associado à formação e reabsorção de tecidos mineralizados. Os primeiros estudos clínicos epidemiológicos demonstraram que o uso contínuo de β -bloqueadores como anti-hipertensivos, estaria associado a uma redução de 23-30% no risco de fraturas vertebrais ou não vertebrais (mão, antebraço, pé) em mulheres menopausadas (PASCO et al., 2004; SCHLIENGER et al., 2004). Levasseur et al. (2003) demonstraram que o β -bloqueador, propranolol,

reverteu a perda óssea causada por ausência de carga em fêmur, modelo bastante utilizado em estudos de metabolismo ósseo. Kondo et al. (2005) também demonstraram que o tratamento com propranolol, assim como o tratamento com guanetidina, impediu a redução da massa óssea observada neste mesmo modelo animal. Yirmiya et al. (2006) demonstraram que em epífise distal femural e da 3ª vértebra lombar, o propranolol atenua as alterações causadas na massa (perda óssea) e na estrutura óssea e previne a inibição da formação óssea induzida pelo modelo de perda óssea causada por depressão (induzida por stress crônico médio). Bonnet et al. (2006) demonstraram que o propranolol reverte a perda óssea em fêmur, tíbia e L4, causada por ovariectomia em ratas e que estes efeitos dependem da dose do propranolol e do tecido analisado. Neste estudo, os autores observaram que o propranolol aumentou a DMO da tíbia, do fêmur e da L4 em ratas ovariectomizadas e preveniu os danos causados a microarquitetura óssea. Zhang et al. (2007) também demonstraram que o propranolol reverte a perda óssea causada por ovariectomia em fêmur, tíbia e 4ª, 5ª e 6ª vértebra lombar em ratas. O propranolol aumentou a densidade mineral óssea do fêmur, da tíbia e das vértebras lombares (4ª, 5ª e 6ª) em ratas ovariectomizadas ao mesmo nível do grupo controle. Ainda no mesmo estudo, foi observado que o propranolol aumentou a área trabecular, o número de trabéculas e diminuiu a separação entre as trabéculas. Todos estes estudos sugerem a participação de receptores β -adrenérgicos, especificamente receptores do tipo β_2 -adrenérgicos, no processo de formação e/ou remodelação óssea, com base de que até o momento, não foram identificados receptores β_1 -adrenérgicos em osteoblastos.

Os receptores adrenérgicos são mais conhecidos por seu papel no sistema cardiovascular, uterino e músculo liso vascular e não-vascular e respiratório. Entretanto, após a demonstração histológica de fibras de noradrenalina nos ossos, estudos farmacológicos tem demonstrado que células osteoblásticas e osteoclásticas apresentam receptores (de noradrenalina) β -adrenérgicos, especificamente receptores do tipo β_2 (BONNET et al., 2008a). Entretanto, em estudos realizados em camundongos deficientes de receptores β_2 -adrenérgicos (ELEFTERIOU et al., 2005) foi demonstrado que o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNS) favorece a reabsorção óssea por aumentar a expressão, no osteoblasto, de um fator de diferenciação de osteoclasto, denominado de RANKL, o qual se liga ao RANK. Ainda neste estudo foi demonstrado que haveria o controle

neuroendócrino deste processo, mediado pela ação da leptina. A leptina é um hormônio produzido pelas células adiposas que exerce vários papéis fisiológicos, incluindo a regulação do SNS. Camundongos deficientes de leptina (ob/ob) possuem uma taxa maior de formação óssea com um aumento concomitante na reabsorção óssea (DUCY et al., 2000 apud TAKEDA, 2008). A infusão intra-cérebro ventricular de leptina diminui a massa óssea tanto em camundongos ob/ob quanto em camundongos selvagens (ELEFTERIOU et al., 2004). Camundongos ob/ob e selvagens tratados com isoproterenol, um agonista β -adrenérgico, apresentaram uma diminuição expressiva da massa óssea, já o tratamento com propranolol aumentou a massa óssea em camundongos selvagens. Elefteriou et al. (2005) demonstraram que a leptina controla a reabsorção óssea, através da sinalização simpática via receptores β_2 -adrenérgicos promovendo a diferenciação de osteoclastos. O mecanismo proposto foi que a leptina agiria no hipotálamo ativando o SNS, levando à ativação de receptores β_2 -adrenérgicos no osteoblasto. O osteoblasto ativado liberaria RANKL que ao se ligar ao receptor RANK na célula precursora de osteoclasto, estimularia sua diferenciação para osteoclasto maduro. Quanto maior a quantidade de osteoclastos ativados, maior a reabsorção óssea.

Várias outras proteínas modulariam este mecanismo como a OPG que compete com o RANKL pelo receptor RANK na célula precursora de osteoclasto (SIMONET et al. 1997; apud SAKAKURA et al. 2005) e células TRAP-positivas (células multinucleadas resistentes a fosfatase ácida tartarato) que são altamente expressas em osteoclastos e macrófagos ativados, com papel semelhante ao osteoclasto.

Recentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que dentes em desenvolvimento funcionam como fatores para diferenciação e ativação de osteoclastos na superfície do osso alveolar (KITAHARA et al., 2002; LIU et al. 1998, 2000) e que o folículo dental tem um papel essencial na atividade de osteoclastos através da regulação do sistema RANKL/OPG (WISE et al., 2000). Outros estudos demonstraram que camundongos RANKL-*knockout* apresentam severa osteopetroses com uma total ausência de osteoclastos e dentes não erupcionados (KIM et al. 2000; KONG et al. 1999). Sakakura et al. (2005) demonstraram a presença de RANKL, OPG e atividade da enzima TRAP nas diferentes áreas e células da cartilagem de Meckel e do folículo dental no interior desta, durante as diferentes fases do período embrionário, distribuídas com diferentes padrões nas

diferentes fases. Sheela Rani e MacDougall (2000) demonstraram a expressão (RNAm e proteínas) de RANKL e OPG em odontoblastos e células da polpa dental em cultura de células de camundongos. No mesmo estudo, através da análise imunohistoquímica observaram a presença de RANKL e OPG em dente de camundongos recém-nascidos. Ohazama et al. (2004) demonstraram que RANK, RANKL e OPG apresentaram um padrão de expressão dinâmico na fase embrionária do desenvolvimento dental (molar) e ósseo. No mesmo estudo, demonstraram também que germens dentais tratados com OPG exógena apresentaram esmalte e dentina mais finos e tecido pulpar esparso. Concluíram, portanto, que o desenvolvimento e o crescimento do dente incisivo estão envolvidos no aparecimento e na diferenciação das células TRAP-positivas, através da regulação diferencial da expressão de RANKL e OPG no folículo dental no momento apropriado e na posição correta. Em conjunto, estes resultados sugerem que o controle da formação e do crescimento dental possa ocorrer através de um mecanismo parecido com o mecanismo de controle da formação e reabsorção óssea via receptores β -adrenérgicos ou via SNS.

Ao considerarmos os estudos acima descritos e ainda, ao considerarmos o atenolol como antagonista de receptores β_1 -adrenérgicos, esperávamos que o tratamento com este antagonista favorecesse a formação ou desenvolvimento ósseo e dental dos filhotes, mas não foram estes os resultados obtidos. No entanto, diferente dos estudos citados, usamos um antagonista seletivo de receptores β_1 -adrenérgicos. A seletividade aos receptores β_1 , o tratamento durante a prenhez iniciado desde o dia 0 (zero), início da fase embrionária e o período de tratamento, que compreendeu todo o período de prenhez e lactação, destaca nosso estudo entre os demais citados.

Os resultados obtidos por nós demonstraram que o tratamento das ratas com atenolol prejudicou a formação e ou desenvolvimento de tecidos mineralizados nos filhotes. Estes resultados poderiam ser considerados contrários aos da literatura, entretanto estudos recentes têm sugerido a participação indireta (sistêmica) dos receptores β_1 , além dos receptores β_2 , no processo de remodelação óssea.

Em estudo clínico sobre fraturas conseqüentes de osteoporose em mulheres na menopausa, foi demonstrada uma inconsistente associação entre uso de antagonistas β_1 -seletivos e menores riscos de fraturas (REID et al, 2005). Estudos experimentais com camundongos deficientes (*knockout*) de ambos os receptores β_1

e β_2 -adrenérgicos apresentaram uma marcante inibição dos índices de formação na cortical óssea dos tecidos analisados (PIERROZ et al., 2006 apud BONNET et al., 2008a). A partir destes dados, foi sugerido que os maiores índices de formação óssea em camundongos deficientes de receptores β_2 dependem da funcionalidade de receptores β_1 -adrenérgicos. Considerando que os receptores β_1 não aparecem e não são expressos no osso (BONNET et al., 2008b), é possível considerar que a sinalização β_1 -adrenérgica estimularia a formação óssea indiretamente, efeito contrário ao efeito inibitório direto da sinalização β_2 -adrenérgica nos osteoblastos. O mecanismo molecular pelo qual os receptores β_1 -adrenérgicos regulariam a formação óssea ainda não foi descrito. No entanto, foi sugerido que enquanto a estimulação de receptores β_2 -adrenérgicos de osteoblastos, leva a osteoclastogênese e induz a perda óssea, a atividade de receptores β_1 -adrenérgicos sistêmicos poderia aumentar os níveis ou a atividade do eixo GH-IGF1 (hormônio de crescimento e fator 1 de crescimento semelhante a insulina), contribuindo para a manutenção da massa óssea (HAMRICK; FERRARI, 2008).

Os resultados obtidos em nosso estudo estariam de acordo com a sugestão sobre a participação dos receptores β_1 no metabolismo ósseo, uma vez que ao inibirmos estes receptores β_1 com atenolol, os efeitos observados estão mais correlacionados com redução de formação e ou desenvolvimento ósseo em ratos Wistar e SHR. Como não encontramos resultados semelhantes na literatura, este trabalho poderia ser considerado um dos primeiros a demonstrar que a transferência vertical direta (rata-filhote) do atenolol, via placenta ou através do leite materno, reduz a DMO do fêmur, tíbia, crista óssea alveolar, 4^a vértebra lombar e do dente incisivo nos filhotes, reduz o comprimento e a largura da tíbia, da L4, do dente incisivo inferior, reduz a largura do fêmur, apesar de não alterar a microdureza dos tecidos ósseos e dentais em filhotes de ratas Wistar tratadas. Como ressaltamos anteriormente, estes efeitos seriam mais evidentes em ratos Wistar do que em SHR, pois nos filhotes de ratas hipertensas sem tratamento as alterações dos tecidos mineralizados, poderiam mascarar o efeito do atenolol.

A partir destes resultados, novos estudos serão conduzidos para analisarmos os possíveis mecanismos associados aos receptores β_1 -adrenérgicos, avaliando a expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG nos tecidos dos filhotes de ratas Wistar e SHR tratadas com atenolol.

6 Conclusões

6 Conclusões

Nossos resultados demonstraram que:

1) SHR apresentam alteração da formação/desenvolvimento de tecidos mineralizados

2) O controle da pressão arterial das ratas durante a prenhez e lactação com atenolol não reverteu às alterações observadas em filhotes SHR.

3) Receptores β_1 -adrenérgicos, antagonizados pelo atenolol, participariam da formação (organogênese) e ou desenvolvimento de tecidos mineralizados (osso e dente). Vários mecanismos poderiam estar envolvidos no efeito do atenolol observado sobre os tecidos mineralizados de filhotes de ratas Wistar e SHR tratadas.

REFERÊNCIAS

Afghani A, Goran MI. Lower bone mineral content in hypertensive compared with normotensive overweight latino children and adolescents. *Am J Hypertens* 2007; 20(2):190-6.

Almeida JHCL. Aspectos perinatais das síndromes hipertensivas na gravidez. Rio de Janeiro; 1995. 151p. 1995. [Dissertação de Mestrado - Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz].

Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis* 2004; 10:249-57.

Asseur R, Sabatier JP, Poteri-Burgot C, Creveuil C, Marcelli C. Sympathetic nervous systems as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine* 2003; 70(3):515-9.

Barrileaux PS, Martin JN. Hypertension therapy during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2002; 45(1):22-34.

Barton JR, Witlin AG, Sibai BM. Management of mild preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42(3):455-69.

Bayliss H, Churchill D, Beevers M, Beevers DG. Anti-hypertensive drugs in pregnancy and fetal growth: evidence for "pharmacological programming" in the first trimester? *Hypertens Pregnancy* 2002; 21(2):161-74.

Bindels RJM, Geertsen JAM, van Os CH. Increased transport of inorganic phosphate in renal brush borders of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1986; 250:F471-6.

Bindels RJM, van den Broek LAM, Jongen MJM, Hackeng WHL, Lowik CWGM, van Os CH. Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflugers Arch* 1987; 408:395-400.

Bloomquist EI, El-Bermani AWI, Yaney GC, Karr-Dillien V. Hypophosphatemia in infant and adult spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1983; A5:447-53.

Boggio V, Ladizesky MG, Cutrera RA, Cardinali DP. Autonomic neural signals in bone: physiological implication for mandible and dental growth. *Life Sci* 2004; 75:383-95.

Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, Delmans PD. The role of mineraliation and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* 2008; 43(3):532-8.

Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318:1118-27.

Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008a; 8(2):94-104.

Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Gonçalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol* 2008b; 217:819-27.

Calvi LM, Shin HI, Knight MC, Weber JM, Young MF, Giovannetti A, et al. Constitutively active PTH/PTHrP receptor in odontoblasts alters odontoblast and ameloblast function and maturation. *Mech Dev* 2004; 121(4):397-408.

Chung NAY, Beevers DG, Lip GYH. Management of hypertension in pregnancy. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001; 1(4):253-62.

Currey JD. The effect of strain rate, reconstruction and mineral content on some mechanical properties of bovine bone. *J Biomech* 1975; 8:81-6.

Currey JD, Zioupos P, Davies P, Casinos A. Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone. *Proc R Soc Lond B* 2001; 268:107-11.

Currey JD. How well are bones designed to resist fractures. *J Bone Miner Res* 2003; 18:591-8.

Dempster DW. The impact of bone turnover and bone-active agents on bone quality: focus on the hip. *Osteoporos Int* 2002; 13:349-52.

Di Nicolantonio R, Koutsis K, Westcott KT, Wlodek ME. Relative contribution of the prenatal versus postnatal period on development of hypertension and growth rate of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:9-16.

Easterling TR, Carr DB, Brateng B, Diederichs C, Schmucker B. Treatment of hypertension in pregnancy: effect of atenolol on maternal disease, preterm delivery, and fetal growth. *Obstet Gynecol* 2001; 98(3):427-33.

Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:3258-63.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Kondo H, et al. Leptin regulation of bone resorption by sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434(24): 514-20.

Elias GP, Santos OAM, Sasaki KT, Delbem ACB, Antoniali C. Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Appl Oral Sci* 2006; 14(4):253-9.

Elias GP. Efeito da hipertensão e do atenolol sobre a atividade salivar e a microdureza dental: estudo experimental em filhotes de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2006.

Elias GP, Sasaki KT, Delbem ACB, Antoniali C. Atenolol reduces salivary activity in pups of spontaneously hypertensive and normotensive rats treated during pregnancy and lactation. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30:1-9.

Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength. A study on human calcaneus. *Bone* 2004; 34:783-9.

Garn SM, Osborne RH, McCabe KD. The effect of prenatal factors on crown dimensions. *Am J Phys Anthropol* 1979; 51:665-78.
Goshi LH, Ibbid SM. Distúrbios de cálcio e magnésio no período neonatal. In: Marcondes E. *Pediatria básica*. 8 ed. São Paulo: Servier; 1994. p.408-11.

Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; Suppl. 1. S242-3.

Haddad B, Sibai BM. Chronic hypertension in pregnancy. *Ann Med* 1999; 31(4):246-52.

Hamrick MW, Ferrari SL. Leptin and the sympathetic connection of fat to bone. *Osteoporos Int* 2008; 19:905-12.

Hebert MF, Carr DB, Anderson GD, Blough D, Green GE, Brateng DA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atenolol during pregnancy and postpartum. *J Clin Pharmacol* 2005; 45:25-33.

Hoffman BB. Terapia da hipertensão. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2007. p. 757-78.

Hsu CH, Chen PS, Caldwell RM. Renal phosphate excretion in spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int* 1984; 25: 789-95.

Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; Suppl. 1: S242-43.

Ishibashi K, Iino T, Sekigushi F. Amelogenesis imperfecta, a new dental mutation in rats. *Lab Anim Sci* 1990; 40(1):16-20.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 605-7.

Kim N, Odgren PR, Kim D-K, Marks SC Jr, Choi Y. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:10905-10.

Kitahara Y, Suda N, Kuroda T, Beck F, Hammond VE, Takano Y. Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone* 2002; 30:48-56.

Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, et al. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem* 2005; 280(34): 30192-200.

Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lympho-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-323.

Kotchen TA, Ott CE, Whitescarver SA, Resnic LM, Gertner JM, Bleschmidt NC. Calcium and calcium regulating hormones in the “prehypertensive” Dahl salt-sensitive rat (calcium and salt-sensitive hypertension). *Am J Hypertens* 1989; 2:747-53.

Kruzic JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2008; 1:3–17.

Lane NE, Yao W, Kinney JH, Modin G, Balooch M, Wronski TJ. Both hPTH(1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. *J Bone Miner Res* 2003; 18(12):2105-15.

Lau K, Zikos D, Spirnak J, Eby B.. Evidence for an intestinal mechanism in hypercalciuria of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1984; 247: 625-33.

Le Noble FAC, Stassen FRM, Hacking WJG, HAJS Boudier. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:1563-72.

Levasseur R, Sabatier JP, Potrel-Burgot C, Lecoq B, Creveuil C, Mercelli C. Sympathetic nervous system as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine* 2003; 70:515-9.

Lindheimer MD, Taler SJ, Cunningha, FG. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens* 2008; 2(6):484-94.

Lip GY, Beevers M, Churchill D, Shaffer LM, Beevers DG. Effect of atenolol on birth weight. *Am J Cardiol* 1997; 79(10):1436-8.

Liu J-G, Tabata MJ, Yamashita K, Matsumura T, Iwamoto M, Kurisu K. Developmental role of PTHrP in murine molars. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:143-6.

Liu J-G, Tabata MJ, Fujii T. Parathyroid hormone-related peptide is involved in protection against invasion of tooth germs by bone via promoting the differentiation of osteoclasts during tooth development. *Mech Dev* 2000; 95:189-200.

Lucas PA, Brown RC, Drueke T, Lacour B, Metz JA, McCarron DA. Abnormal vitamin D metabolism intestinal calcium transport, and bone status in the spontaneously hypertensive rat compared with its genetic control. *J Clin Invest* 1986; 78: 221-7.

Lydakis C, Lip GYH, Beevers M, Beevers DG. Atenolol and fetal growth in pregnancies complicated by hypertension. *Am J Hypertens* 1999; 12:541-7.

Magee L, Ornstein M, von Dadelszen P. Fortnightly review: management of hypertension in pregnancy. *Br Med J* 1999; 318:1332-6.

McCarron DA, Fingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to an urinary calcium leak. *Hypertension* 1980; 2:162-8.

McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbance of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1981; 3(suppl.1): 162-7.

McCarron DA. Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1982; 307:226-8.

Merke J, Lucas PA, Szabo A, Cournot-Witmer G, Mall G, Bouillon R, et al. Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1989; 13:233-42.

Minkowitz B, Boskey AL, Lane JM, Pearlman HS, Vigorita VJ. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J Orthop Res* 1991; 9(6):869-75.

Naito S, Ito M, Sckine I, Ito M, Hirano T, Iwasaki K, et al. Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). *Bone* 1993; 14:745-53.

Ness RB, Roberts JM. Epidemiology of hypertension. In: Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG, editors. *Chesley's Hypertensive disorders in Pregnancy*, 2nd ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 1999: 43-65.

O'Dowd R, Kent JC, Moseley JM, Wlodek ME. Effects of uteroplacental insufficiency and reducing litter size on maternal mammary function and postnatal offspring growth. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294:R539-48.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res* 2004; 83(3):241-44.

Oyen ML. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *J Biomech* 2006; 39:2699-702.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson G.C. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Gee Long osteoporosis study. *J Bone Miner Res* 2004; 19(1):19-24.

Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88(1):93-7.

Pérez-Castrillón JL, Justo I, Silva J, Sanz A, Igea R, Escudero P, et al. Bone mass and bone modelling markers in hypertensive postmenopausal women. *J Hum Hypertens* 2003; 17:107-10.

Peterlik H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. From brittle to ductile fracture of bone tissue by using an extreme biological example. *Connect Tissue Res* 2000; 41:229–48.

Petty ER. Hardness testing. In: *Measurement of mechanical properties (technics of metals research, vol. V/II, R.F.Bunshar ed.)* p. 157-221. New York, London, Sydney, Toronto. Interscience Publishers, 1971.

Pludowski P, Litwin M, Sladowska J, Antoniewicz J, Niemirska A, Wierzbicka A, et al. Bone mass and body composition in children and adolescents with primary hypertension. *Hypertension* 2008; 51:77-83.

Qasqas SA, McPherson C, Frishman WH, Elkayam U. Cardiovascular pharmacotherapeutic considerations during pregnancy and lactation. *Cardiol Rev* 2004; 12(4):201-21.

Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS et al. B-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2005; 20(4):613-8.

Ritchie RO, Kinney JH, Kruzic JJ, Nalla RK. A fracture mechanics and mechanistic approach to the failure of cortical bone. *Fatigue Fract Engng Mater Struct* 2005; 28:345–71.

Sakakura Y, Tsuruga E, Irie K, Hosokawa Y, Nakamura H, Yajima T. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J Anat* 2005; 207:325-37.

Sasaki T, Takagi M, Yanasawa T. Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation. *Ciba Found Symp* 1997; 205:32-46.

Schedl HP, Miller DL, Wilson HP, Horst RL, Natarajan K, Conway T. Intestinal calcium transport in the spontaneously hypertensive rat: Response to calcium depletion. *Am J Physiol* 1986; 250:412-9.

Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and the risk of fracture. *JAMA* 2004; 292(11):1326-32.

Seeman E, Delmas PD. Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354:2250-61.

Sheela Rani CS, Mac Dougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3:145-52.

Sheng ZF, Dai RC, Wang P, Yao XF, Feng XQ, Fang LN, et al. Nanomechanical properties of vertebral trabeculae in ovariectomized rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86(8):515-9.

Shibahara M, Nishida K, Asahara H, Yoshikawa T, Mitani S, Kondo Y, et al. Increased osteocyte apoptosis during the development of femoral head osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med Okayama* 2000; 54(2):67-74.

Shimada A, Shibata T, Komatsu K. Relationship between the tooth eruption and regional blood flow in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Arch Oral Biol* 2004; 49:427-33.

Shinoda H. Effect of long-term administration of fluoride on physico-chemical properties of the rat incisor enamel. *Calcif Tissue Res* 1975; 18:91-100.

Shulman JD. Is there an association between low birth weight and caries in the primary dentition? *Caries Res* 2005; 39:161-67.

Silva ARS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Revista Odonto Ciência* 2007; 22 (55):77-81.

Stern N, Lee DBN, Silis V, Beck FWJ, Deftos L, Manolagas SC, et al. Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 1984; 6:639-46.

Tabacova SA, Kimmel CA. Atenolol: pharmacokinetic/dynamic aspects of comparative developmental toxicity. *Reprod Toxicol* 2002; 16:1-7.

Tabacova S, Kimmel CA, Wall K, Hansen D. Atenolol developmental toxicity: animal-to-human comparisons. *Birth Defects Res* 2003; 67: 181-92.

Takano Y. Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 1995; 33(1-3):127-137.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111:305-17.

Takeda S. Central control of bone remodelling. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 802-7.

Umemura S, Smyth DD, Nicar M, Rapp JP, Pettinger WA. Altered calcium homeostasis in Dahl hypertensive rats: Physiological and biochemical studies. *J Hypertens* 1986; 4:19-26.

Wang T-M, Hsu J-F, Jee WSS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* 1993; 20:251-64.

Wang H, Olszewski B, Rosebury W, Wang D, Robertson A, Keiser JA. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:363-8.

Westfall T, Westfall D. Agonistas e Antagonistas Adrenérgicos. In: Laurence L. Brunton. *Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11^a. Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006. p. 215-264.

Wlodek ME, Westcott KT, Ho PWM, Serruto A, Di Nicolantonio R, Farrugia W, et al. Reduced fetal, placental, and amniotic fluid PTHrP in the growth-restricted spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000; 279:R31-8.

Wlodek ME, Koutsis K, Westcott KT, Ho PWM, Di Nicolantonio R, Moseley JM. The spontaneously hypertensive rat fetus, not the mother, is responsible for the reduced amniotic fluid PTHrP concentrations and growth restriction. *Placenta* 2001; 22:646-51.

Wlodek ME, Westcott K T, Serruto A, O'Dowd R, Wassef L, Ho P W M et al. Impaired mammary function and parathyroid hormone-related protein during lactation in growth-restricted spontaneously hypertensive rats. *J Endocrinol* 2003; 178:233-45.

Wlodek ME, Westcott KT, O'Dowd R, Serruto A, Wassef L, Moritz KM, et al. Uteroplacental restriction in the rat impairs fetal growth in association with alterations in placental growth factors including PTHrP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R1620-7.

Wright GL, Toraason MA, Barbe JJ, Crouse W. The concentration of ionic and total calcium in plasma of the spontaneously hypertensive rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58:1494-9.

Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982; 243:H365-70.

Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats; *Metabolism* 2000; 49(9):1130-33.

Yamori Y, Swales JD. The spontaneously hypertensive rat. In: Swales JD. *Textbook of hypertension*. Oxford: Blackwell Scientific Press 1994; p. 447-55.

Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, et al. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(45):16876-81.

Zhang YC, Bui JD, Shen L, Phillips MI. Antisense inhibition of beta₁-adrenergic receptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2000; 101(6):682-8.

Zhang W, Kanehara M, Zhang Y, Wang X, Ishida T. Beta-blocker and other analogous treatments that affect bone mass and sympathetic nerve activity in ovariectomized rats. *Am J Chin Med* 2007; 35:89-101.

Zioupou P, Currey JD, Casinos A. Exploring the effects of hypermineralisation in bone. *Nat Mater* 2006; 5:52-5.

Anexos

Anexos

ANEXO A- Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP, de acordo com o protocolo no. 2007-003175.

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba</p>	
<p>COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)</p>		
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o Projeto "ESTUDO DO EFEITO DO ATENOLOL SOBRE A MINERALIZAÇÃO DE DENTES DE FILHOTES DE RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) E NORMOTENSAS TRATADAS" sob responsabilidade do Prof Ass Dr CRISTINA ANTONIALI SILVA e colaboração de DANIELA VENDRAME BERTUCCI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 27 de abril de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007- 003175.</p>		
<p>Araçatuba, 17 de maio de 2007.</p>		
		
<p>Prof Dr WAGNER LUIS FERREIRA Vice- Presidente da CEEA - FOA/UNESP</p>		
<p><small>Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP Tel (18) 3636-3200</small></p>		