



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**



**MARIANA NOGUEIRA DE  
FIGUEIREDO**

**“Efeito da inibição da ativação plaquetária  
durante o desenvolvimento da doença  
periodontal em ratos”**

ARARAQUARA

**2010**



**MARIANA NOGUEIRA DE  
FIGUEIREDO**

**“Efeito da inibição da ativação plaquetária  
durante o desenvolvimento da doença  
periodontal em ratos”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Odontologia – Área de  
Periodontia, da Faculdade de Odontologia  
de Araraquara, Universidade Estadual  
Paulista, para o título de mestre em  
Odontologia.

*Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos  
Spolidorio*

ARARAQUARA

**2010**

Figueiredo, Mariana Nogueira de

Efeito da inibição da ativação plaquetária durante o desenvolvimento da doença periodontal em ratos / Mariana Nogueira de Figueiredo.– Araraquara: [s.n.], 2010.

57 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

1. Plaquetas 2. Periodontite 3. Inibidores da agregação de  
plaquetas 4. Inflamação I. Título

**MARIANA NOGUEIRA DE FIGUEIREDO**

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Claudia Maria coelho Alves

Araraquara, 24 de março de 2010

## ***DADOS CURRICULARES***

***Mariana Figueiredo***

**NASCIMENTO** 26 de Março de 1982 – São Luís/ MA

**FILIAÇÃO** Silvio Luiz de Figueiredo  
Teresa Cristina Nogueira de Figueiredo

**2000-2006** Graduação em Odontologia  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

**2006-2008** Especialização em Implantodontia  
APCD – Araraquara/SP

**2008-2010** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

## ***Dedicatória***

Aos meus pais, **Silvio e Cristina**, pelo amor, dedicação e exemplo que me fazem, cada dia mais, me espelhar em suas trajetórias. Não consigo imaginar como teriam sido esses dois anos sem o apoio e a presença de vocês. Minha admiração e gratidão por vocês são inexplicáveis.

Aos meus irmãos, **Vinícius e Victor (Lecão)**, pelo apoio e companheirismo de sempre. Amo vocês. Agradeço a Deus nosso convívio.

À minha avó, **Ruth**, querida, linda, maravilhosa. Pelo amor e carinho de sempre, pelas conversas inspiradoras, por ser simplesmente ela, simplesmente avó, a melhor que eu poderia ter.

## *Agradecimentos especiais*

A **Deus**, por me mostrar, dia após dia, que verdadeiramente todas as coisas cooperam para o bem daqueles que O amam. Não tenho dúvidas da Sua mão durante todos os momentos que aqui vivi, nas pessoas que me acolheram, nas oportunidades que me foram dadas. E, muito mais do que nesta conquista, eu me glorio nas tribulações que aqui passei. Pois estou certa de que elas operaram em mim a paciência e perseverança.

Ao **Prof Dr. Luís Carlos Spolidorio**, pelo empenho dedicado a esta pesquisa e pela compreensão em meus momentos de ausência. Sua maestria em exercer essa profissão é encantadora. Lembranças guardadas no coração são inesquecíveis, e é nele que guardo cada um de nossos momentos. Minha eterna admiração e gratidão.

À mestrandia **Leila Santana Coimbra**, pela decisão difícil de seguir com este trabalho durante minha ausência, trabalhando arduamente e brilhantemente, diga-se de passagem. Muito obrigada e perdão por não ter podido partilhar desses momentos de maneira mais intensa.

Ao **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, pela compreensão e apoio durante minha ausência e pela competência com que coordenou este curso ao longo desses anos.

À amiga irmã, **Alliny de Souza Bastos (Querida Clementina)**, ter te conhecido e convivido contigo foi um dos meus melhores presentes aqui. Obrigada por tudo, sentirei saudades.

À **Regina Lúcia**, pela atenção, carinho e paciência em todos os momentos em que sua ajuda foi requisitada.

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr, José Cláudio Martins Segalla, e Vice-Diretora Andreia Affonso Barreto Montandon.

Aos docentes do curso de pós-graduação, pelo exemplo e formação.

Ao amigo, José Antônio Zuanon, pela ajuda na preparação dos blocos e cortes histológicos.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, pelo convívio agradável ao longo desses anos.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, pela cooperação e convivência harmônica.



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

Albert Einsten

# Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Ativação plaquetária e a doença periodontal.....	14
2.2 Doença periodontal experimental.....	16
2.3 Antiagregantes plaquetários.....	18
3 PROPOSIÇÃO.....	22
4 OBJETIVO GERAL.....	22
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
6.1 Animais.....	23
6.2 Avaliação prévia dos efeitos da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a quantidade de plaquetas e leucócitos no sangue.....	23
6.3 Indução da doença periodontal experimental.....	24
6.4 Avaliação do efeito da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a evolução da doença periodontal.....	25
6.5 Tratamento com aspirina, ticlopidina e clopidogrel.....	25
6.6 Obtenção das amostras e delineamento experimental.....	26
6.7 Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA <sub>2</sub> .....	27

6.8	Análise histológica.....	27
6.9	Análise estatística.....	29
7	RESULTADOS.....	30
7.1	Aviação do peso e aspectos gerais dos animais.....	30
7.2	Avaliação da quantidade de plaquetas e leucócitos circulantes no sangue de ratos tratados com aspirina (30mg/Kg), ticlopidina (300mg/Kg) e clopidogrel (25mg/Kg).....	30
7.3	Análise da concentração de citocinas.....	32
7.4	Análise histológica.....	34
7.4.1	Análise descritiva das alterações histológicas.....	34
7.4.2	Análise quantitativa da reabsorção óssea.....	42
8	DISCUSSÃO.....	44
9	CONCLUSÃO.....	48
10	REFERÊNCIAS.....	49

Figueiredo MN. Efeito da inibição da ativação plaquetária durante o desenvolvimento da doença periodontal em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração da aspirina (AAS), do clopidogrel (Clo) e da ticlopidina (Tic) sobre a evolução da periodontite experimental em ratos. Cinquenta ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n=10), sendo 1 controle e 4 submetidos à periodontite através da instalação de ligadura bilateral na região de primeiro molar inferior. Os ratos submetidos à periodontite experimental foram tratados com solução de NaCl 0,9%, AAS (30mg/kg), Clo (75 mg/kg) e Tic (300 mg/kg), com uma única dose e diariamente, via gavagem. Após 15 dias de tratamento, os animais foram sacrificados, as hemimandíbulas do lado direito removidas para análise histológica e as gengivas do lado esquerdo para avaliação da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA-2 por ELISA. O tratamento com as drogas antiplaquetárias induziu diminuição da expressão dos mediadores próinflamatórios analisados. Histologicamente, os animais tratados com drogas antiplaquetárias apresentaram gengiva com menor quantidade de células inflamatórias e maior quantidade de feixes de fibras colágenas suprajacentes ao osso alveolar. Os valores das medidas morfométricas foram significativamente menores nos animais tratados com derivados tienopiridínicos, enquanto os animais tratados com AAS apresentaram apenas uma tendência a menor reabsorção óssea quando comparados ao grupo NaCl 0,9%. Esses dados despertam o potencial anti-inflamatório das drogas antiplaquetárias e confirmam o envolvimento plaquetário no desenvolvimento da doença periodontal.

Palavras-chave: Plaquetas; periodontite; inibidores de agregação plaquetária; inflamação.

Figueiredo MN. Effect of inhibition of platelet activation during the development of periodontal disease in rats [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of administration of aspirin (AAS), clopidogrel (Clo) and ticlopidine (Tic) on the evolution of experimental periodontitis in rats. Fifty rats (*Rattus norvegicus albinos*, Holtzman) were randomly divided into 5 groups (n = 10), with 1 control and 4 subjected to periodontitis through the installation of bilateral ligature in the region of first molar. The rats subjected to experimental periodontitis were treated with NaCl 0.9%, AAS (30 mg / kg), Clo (75 mg / kg) and Tic (300 mg / kg), with a single dose and daily by gavage. After 15 days of treatment, the animals were killed, the right hemi-jaw removed for histological analysis and gingival tissues on the left to evaluate the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and TXA-2 by ELISA. Treatment with antiplatelet drugs induced decrease in expression of proinflammatory mediators analyzed. Histologically, the animals treated with antiplatelet drugs had gingival tissues with fewer inflammatory cells and larger bundles of collagen fibers overlying the alveolar bone. The values of morphometric measurements were significantly lower in animals treated with thienopyridine derivatives, while animals treated with AAS showed only a trend to lower bone resorption when compared with 0.9% NaCl. These data awaken the potential anti-inflammatory drugs antiplatelet and confirm the involvement of platelets in the development of periodontal disease

Keywords: Platelets; periodontitis; inhibitors of platelet aggregation; inflammation.

## 1. Introdução

Plaquetas contêm potentes fatores estimuladores angiogênicos, incluindo VEGF (fator de crescimento celular endotelial vascular)<sup>10,14</sup>, fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas<sup>50</sup>, EGF (fator de crescimento epidermal)<sup>16,33</sup> e fator ativador derivado de plaquetas (PAF)<sup>13,41</sup>. Contêm também fatores anti-angiogênicos, como a endostatina<sup>20,46</sup>. A endostatina inibe a proliferação e migração de células endoteliais, assim como induz apoptose celular<sup>55,25</sup>. Além de produzir fatores estimuladores e inibidores angiogênicos, as plaquetas ativadas podem estimular o fator de Hageman ou fator XII, desencadeando o sistema das cininas e da coagulação, originando mediadores químicos que, por sua vez, participam ativamente no desenvolvimento do processo inflamatório<sup>12,27</sup>. Uma alteração no caráter e função de plaquetas é manifestada em pacientes com doenças inflamatórias e essas alterações têm sido dissociadas do conhecido envolvimento das plaquetas com processos como trombose e hemostasia. Sugere-se também que plaquetas agem como células inflamatórias inatas em respostas imunes, como sentinelas respondendo à invasão microbiana, orquestrando recrutamento leucocitário e migração através do tecido, influenciando no processo de reparo em doenças crônicas. A ativação plaquetária e a formação do complexo leucócito-plaqueta são diretamente influenciados por citocinas e ocorre rapidamente mediante baixos níveis de ADP<sup>62</sup>. Plaquetas contêm ainda numerosas enzimas, como as metaloproteinasas (MMPs) que interferem na composição e integridade da membrana celular e tecidual<sup>18,27,34</sup>. Isso induz, além da liberação de fatores de crescimento relacionados ao reparo tecidual, a diapedese de leucócitos<sup>21</sup>.

As diversas funções do Fator tecidual (FT) são importantes na relação entre inflamação e coagulação. Citocinas inflamatórias, oriundas de grânulos plaquetários, induzem a expressão de FT em leucócitos e células endoteliais e formam complexos entre FT e fatores de coagulação (FVIIa ou Xa), cuja formação é fundamental para iniciar o processo de coagulação. Paralelamente a esses efeitos, o FT também é capaz de realizar transdução de sinais inflamatórios,

mediando, assim, as reações desse tipo<sup>70</sup>. Portanto, os mecanismos pelos quais as plaquetas participam da inflamação e reparação de uma maneira geral são diversos.

A presença de bactérias periodontopatógenas no sítio periodontal libera determinadas endotoxinas que afetam a integridade endotelial e são capazes de induzir a produção de mediadores químicos derivados de proteínas plasmáticas e da coagulação sanguínea e ao mesmo tempo alterar a função plaquetária. Dentre os periodontopatógenos, *Streptococcus sanguis* e *Porphyromonas gingivalis* liberam proteínas capazes de causar ativação plaquetária<sup>72</sup>. Acredita-se que na presença desses micro-organismos há destruição de células endoteliais da mucosa, com subsequente invasão do tecido conjuntivo resultando em desenvolvimento da inflamação periodontal e ativação plaquetária<sup>48</sup>.

Diversas drogas antiplaquetárias são utilizadas na clínica médica com a finalidade de inibir as funções plaquetárias e, assim, diminuir a incidência de trombos. O medicamento mais comumente utilizado ainda é a aspirina (AAS), embora possa também ser prescrito outros agentes orais, como ticlopidina, clopidrogrel, ou dipiridamol, ou drogas antiplaquetárias intravenosas, como abciximab. Cada agente afeta as plaquetas de modo diferenciado, podendo apresentar efeitos colaterais únicos ou distintos. Contudo, todos têm efeito de inativação plaquetária e causam redução em ambos os processos, de adesividade e agregação plaquetária, bem como reações de liberação<sup>59,62,72</sup>.

A associação entre plaquetas e progressão da doença periodontal (DP) tem sido pouco explorada e, conseqüentemente, os resultados ainda são escassos e inconclusivos.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Ativação plaquetária e a Doença Periodontal**

A doença periodontal é uma doença crônica que afeta as estruturas de suporte e de proteção dos dentes (Carranza et al.<sup>15</sup>, 2007; Lindhe et al.<sup>42</sup>, 2005). É uma das infecções mais comuns em humanos, afetando, em sua forma mais severa, aproximadamente 10% da população (Pihlstrom et al.<sup>61</sup>, 2005). Tem como agente etiológico primário o biofilme dental que atua por meio de mecanismos diretos, causando destruição tecidual pela liberação de enzimas líticas e produtos citotóxicos; e indiretos, desencadeando as reações de defesa do hospedeiro que podem resultar em destruição progressiva do periodonto (Page et al.<sup>56</sup>, 1997). Contudo, esses micro-organismos não são capazes, por si só, de desenvolver a doença periodontal, para isso é necessária a interação destes com fatores de risco do hospedeiro (Slots et al.<sup>71</sup>, 2001).

O conceito atual de etiologia multifatorial das doenças periodontais inclui o hospedeiro como componente fundamental. De fato, o conhecimento relativo à etiologia, à patogênese e ao tratamento das periodontopatias avançou muito com os estudos dos fatores relacionados ao hospedeiro, incluindo suas características genéticas e mecanismos da resposta imunológica. Sabe-se que o efeito prejudicial mais importante pode ser da própria resposta imune do hospedeiro aos antígenos representados pelos microrganismos.

A inflamação dos tecidos periodontais resulta em bolsas periodontais e ulceração epitelial, aumentando, assim, a suscetibilidade a bacteremias transitórias. Essa bacteremia normalmente induz produção crônica de mediadores pró-inflamatórios como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TXA<sub>2</sub>, proteína C reativa (PCR) e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (D'aiuto et al.<sup>23</sup>, 2006; Kereiakes et al.<sup>37</sup>, 2003).

O aumento no número de plaquetas e da ativação plaquetária são características da inflamação sistêmica e a periodontite também tem sido



associada a um elevado número de plaquetas (Klinger, Jelkmann<sup>39</sup>, 2002; Wakai, Kawamura<sup>81</sup>, 1999).

Linhagens de reconhecidos patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Streptococcus Sanguis* induzem a ativação e a agregação plaquetária *in vitro* e em estudos com animais (Herzberg<sup>32</sup>, 1998; Lourbakos et al.<sup>44</sup>, 2001; Naito et al.<sup>52</sup>, 2006). E várias evidências apóiam o papel das plaquetas como células inflamatórias. Essas células fornecem uma ampla gama de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios e, além de conter e expressar esses mediadores após sua ativação, as plaquetas podem também induzir a expressão de TNF $\alpha$  e quimiocinas em monócitos e macrófagos (Aukrust et al.<sup>3</sup>, 2001).

Estudos recentes sugerem que plaquetas podem modular a função de leucócitos (por exemplo, células natural killer, granulócitos e células T) e que, além de induzir a resposta inflamatória de leucócitos e células endoteliais, podem também responder aos mediadores inflamatórios produzidos por estas células (Aukrust et al.<sup>3</sup>, 2001; Weyrich, Zimmerman<sup>85</sup>, 2004).

Está claro que as plaquetas têm mecanismos de sinalização celular que se estendem muito além de seus papéis tradicionais de homeostase. Recentes observações indicam que as plaquetas têm um papel fundamental na resposta adaptativa durante desafio microbiano e antigênico, indo além de sua conhecida capacidade de defesa aguda em lesões teciduais, e sugerem que esses mecanismos podem ser desregulados na doença (Aukrust et al.<sup>3</sup>, 2001; Weyrich, Zimmerman<sup>85</sup>, 2004). Contudo, estudos adicionais são necessários para elucidar as funções dessas células nas interações imunológicas.

## 2.2 Doença Periodontal Experimental

Devido à grande dificuldade de se estudar a doença periodontal em humanos, os experimentos para elucidação de sua patogênese têm sido realizados em animais. E a periodontite, ao contrário de outras doenças infecciosas, que não existem em outras espécies além do homem, é bem difundida no meio animal (Klausen<sup>38</sup>, 1991).

Os primatas são melhor modelo animal em função da sua semelhança com o homem. Contudo, em função da maior dificuldade de manipulação e maior custo, o rato é o animal mais frequentemente utilizado em estudos de periodontite experimental (Klausen<sup>38</sup>, 1991).

O rato possui um incisivo e três molares em cada quadrante. Os incisivos, por serem dentes que estão em contínuo crescimento, não são indicados como modelo de doença periodontal. Em contrapartida, os molares possuem estrutura e organização periodontal muito semelhantes aos humanos, diferenciando-se apenas por apresentar epitélio sulcular queratinizado. Apesar de esta estrutura tecidual poder funcionar como barreira protetora, impedindo o início da resposta inflamatória, estudos demonstraram que, quando inserido material no sulco gengival de ratos, o mesmo penetrou no tecido conjuntivo via epitélio juncional (Romanowski et al.<sup>66</sup>, 1998; Takata et al.<sup>75</sup>, 1988). Assim, não há motivos para crer que a função de barreira exercida pela gengiva seja diferente em ratos, embora a extensão da área afetada possa ser maior em humanos.

Os modelos experimentais de indução de doença periodontal em ratos mais utilizados são: a injeção de LPS bacteriano e indução por ligadura. O primeiro consiste na injeção de LPS na região palatina entre o 1º e 2º molar do animal, esse método é bastante utilizado para indução de reabsorção óssea periodontal (Rogers et al.<sup>65</sup>, 2007)

O modelo de indução da periodontite experimental por ligadura consiste na colocação de um fio de nylon, de seda, ou algodão ao redor da cervical de um dente molar. Essa ligadura atua como irritante gengival resultando em

achatamento e deslocamento da margem gengival, acúmulo de biofilme bacteriano, aumento da proliferação de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente, migração do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar (Johnson<sup>35</sup>, 1975).

O procedimento de colocação da ligadura invariavelmente resulta em injúria traumática e, apenas como efeito secundário, age como fator receptivo de placa bacteriana. Esse fato tem sido bastante questionado (Nyman et al.<sup>54</sup>, 1979).

Ao avaliar a indução de doença periodontal em primeiros molares inferiores com ligaduras de seda em animais livres de germes, Rovin et al.<sup>67</sup>(1966), verificaram que esses animais não apresentaram nenhuma evidência de resposta inflamatória. Sallay et al.<sup>68</sup>, em 1982, a fim de avaliar se a destruição periodontal decorrente da colocação de ligadura era decorrente de trauma mecânico e não da presença de bactérias, administraram antibióticos previamente a colocação da ligadura e clorexidina uma vez ao dia para controle de biofilme. Como resultado, observaram inibição da perda óssea alveolar, demonstrando o caráter infeccioso da periodontite experimental.

Assim, os eventos ocorridos na periodontite experimental induzida por ligadura em ratos são os que mais se assemelham aos ocorridos na doença periodontal em humanos. A destruição dos tecidos de suporte, em ratos e humanos, é resultado da resposta do hospedeiro frente à presença de bactérias periodontopatógenas.

### 2.3 Antiagregantes Plaquetários

Antiagregantes plaquetários constituem um grupo de fármacos diversos que têm em comum a propriedade de inibir a formação de trombos, sem interferir de maneira significativa nos demais segmentos da coagulação. Promovem alterações nas funções plaquetárias como inibição da adesividade e agregação, da liberação ou secreção das plaquetas, reduzem os agregados plaquetários circulantes e inibem a formação do trombo, induzido predominantemente por plaquetas (Couto<sup>22</sup>, 1998).

Os mecanismos de ação desses agentes são variados podendo atuar: na via do ácido aracdônico; no aumento do amp cíclico plaquetário; na inibição do ADP e da ligação do fibrinogênio com receptores de glicoproteínas; nos antagonistas dos receptores de glicoproteínas e nos inibidores de antagonistas específicos (Batlouni<sup>4</sup>, 1999).

Dos antiagregantes a aspirina (AAS) é o mais empregado e, conseqüentemente, o mais bem conhecido em sua classe. Ela induz um defeito de longa duração nas plaquetas, clinicamente detectável por prolongamento no tempo de sangramento. Esse efeito está primariamente, se não exclusivamente, relacionado com a inativação permanente da prostaglandina sintetase que catalisa o primeiro passo na síntese de prostaglandinas: a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina H2 (PGH2) (Patrono<sup>59</sup>, 2001).

A PGH2 é responsável pela liberação do tromboxano A2 (TXA2), um potente agregante plaquetário e vasoconstrictor. Este tem suas ações contrabalançadas pela liberação da prostaciclina (PGI2) das células endoteliais vasculares, produzindo vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária. O TXA2 é por essência um derivado plaquetário, altamente sensível à ação do AAS, liberado pelas plaquetas em resposta a uma variedade de estímulos e participa da manutenção das funções celulares regulando a interação entre as plaquetas e o endotélio. O tempo de ação da aspirina persiste por aproximadamente 10 dias, que é o tempo de meia-vida das plaquetas (Patrono<sup>59</sup>, 2001).

Estudos randomizados demonstram que baixas doses como, 75 mg, são efetivas para redução de trombos e do risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) e angina crônica em humanos (Sugidachi et al.<sup>73</sup>,2000; Taylor et al.<sup>76</sup>, 1999). Em ratos, uma dose de 30mg/Kg de peso corporal/dia é suficiente para impedir a formação de trombos (Ashida et al.<sup>2</sup>, 1979; Sasaki et al.<sup>69</sup>, 1982; Sugidachi et al.<sup>73</sup>,2000; Taka et al.<sup>74</sup>, 1999; Wallace<sup>79</sup>, 1999; Wallace et al.<sup>80</sup>, 1995).

A ticlopidina e o clopidogrel são derivados tienopiridínicos que agem como inibidores seletivos da adenosina difosfato – ADP (indutor da agregação plaquetária), não tendo efeito direto no metabolismo do ácido aracônico (Patrono et al.<sup>60</sup>, 2001; Sugidachi et al.<sup>73</sup>, 2000)(Figura1).

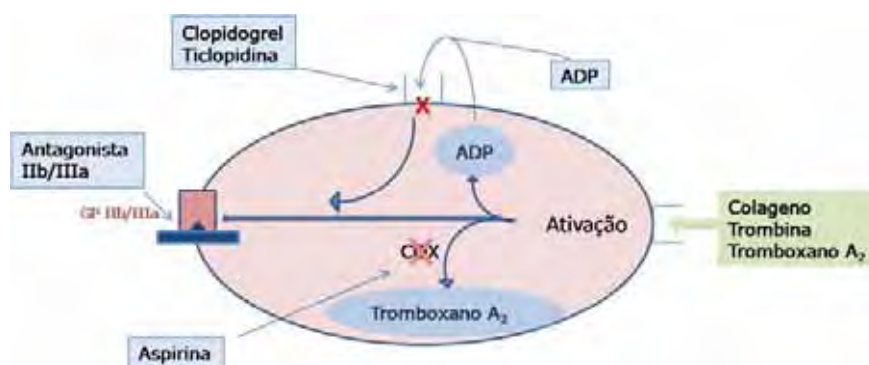


FIGURA 1- Mecanismo de ação da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre as plaquetas.

A ticlopidina tem efeito cumulativo, aumentando aproximadamente três vezes o nível sérico de uma dose isolada de 250 mg, após seu uso contínuo por 2 a 3 semanas. Em ratos 300mg/ Kg de peso corporal /dia é a dose indicada para inibição da agregação plaquetária e formação de trombos (Ashida et al.<sup>2</sup>, 1979; Quin, Fitzgerald<sup>63</sup>, 1999; Sasaki et al.<sup>69</sup>, 1996; Sugidachi et al.<sup>73</sup>, 2000; Taka et al.<sup>74</sup>, 1999; Wallace<sup>79</sup>, 1999; Wallace et al.<sup>80</sup>). Seu emprego tem sido

recomendado para pacientes com AVC, isquemia cerebral transitória (ICT), síndrome coronariana aguda sem supra de ST, claudicação intermitente e, ainda, pacientes submetidos a “bypass” aorto-coronário (Patrono et al.<sup>60</sup>, 2001; Taylor et al.<sup>76</sup>, 1999). A presença de significativos efeitos secundários não desejáveis, como trombocitopenia, aplasia medular, púrpura, neutropenia e hipercolesterolemia, e o custo elevado limita seu uso em menor escala (Patrono et al.<sup>60</sup>, 2001).

O clopidogrel é rapidamente absorvido e metabolizado em um derivado do ácido carboxílico, que tem meia-vida de aproximadamente 8 horas. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP. Essa inibição é dose dependente e pode ser detectada 2 horas após a ingestão de 400mg, mantendo-se estável por 48 horas e tornando-se mais efetiva com doses diárias de 50 mg. Após a primeira semana de uso atinge-se 50 a 60% de inibição. A administração de 25mg/ Kg de peso corporal /dia em ratos é a dosagem indicada para se obter o efeito antiagregante plaquetário (Ashida et al.<sup>2</sup>, 1979; Quin, Fitzgerald<sup>63</sup>, 1999; Sasaki et al.<sup>69</sup>, 1996; Sugidachi et al.<sup>73</sup>, 2000; Taka et al.<sup>74</sup>, 1999; Wallace<sup>79</sup>, 1999; Wallace et al.<sup>80</sup>).

Assim como a aspirina, o clopidogrel pode causar um defeito permanente em uma proteína plaquetária, o qual desaparece após 7 dias da retirada da droga<sup>8</sup>. Os efeitos secundários indesejáveis descritos são diarreia e *rash* cutâneo e ainda a ocorrência de púrpura trombocitopênica trombótica, que ocorre nas primeiras 2 semanas do uso do medicamento (Bennett et al.<sup>7</sup>, 2001).

Somado ao conhecido efeito antitrombótico dos agentes antiagregantes, estudos em larga escala têm estabelecido o potencial anti-inflamatório dessas drogas. A aspirina, ao inibir a cicloxigenase (COX), diminui a produção de TXA2, o qual induz o acúmulo de plaquetas e diminui a ativação de NF-κB, uma das proteínas celulares que, após o processo de transdução e tradução, é ativada iniciando a resposta inflamatória (Chen et al.<sup>17</sup>, 2006). Estudos indicam que a administração de ticlopidina melhora significativamente o percentual de

neutrófilos apoptóticos, sugerindo ser esta droga um agente efetivo na melhora da resolução do processo inflamatório (Wang, Leigh<sup>83</sup>, 2005). O exato mecanismo anti-inflamatório do clopidogrel ainda não está bem estabelecido. Sugere-se que a inativação plaquetária induzida por esse fármaco ative a liberação de variados fatores que induzem a migração e multiplicação de macrófagos. Contudo, possivelmente outros mecanismos podem existir além desse (Chen et al.<sup>17</sup>, 2006; Kereiakes<sup>36</sup>, 2003).

### **3. Proposição**

Plaquetas secretam importantes mediadores envolvidos no processo inflamatório periodontal. O presente trabalho avança a hipótese de que drogas antiplaquetárias, ao inibir a ativação dessas células, podem alterar o desenvolvimento da periodontite experimental.

### **4. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de drogas antiplaquetárias (aspirina, ticlopidina e clopidogrel) no desenvolvimento da doença periodontal experimental.

### **5. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da administração de aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a quantidade de plaquetas e leucócitos circulantes no sangue (WBC).

- Avaliar o efeito de drogas antiplaquetárias (aspirina, ticlopidina e clopidogrel), durante o desenvolvimento da doença periodontal experimental, sobre:

- ✓ citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA<sub>2</sub>)
- ✓ células inflamatórias e fibras colágenas
- ✓ processo de reabsorção óssea



## **6. Material e método**

### **6.1 Animais**

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP (Proc. CEEA nº10/2008) e realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), machos, com peso médio de 250-300 gramas provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara. Os animais foram aleatoriamente separados em 5 grupos de igual número e mantidos em gaiolas plásticas em um ambiente com temperatura ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12h escuro) controlados, e alimentados com água e ração *ad libitum*.

### **6.2 Avaliação prévia dos efeitos da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a quantidade de plaquetas e leucócitos no sangue**

Para avaliação da ação da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a quantidade de plaquetas e leucócitos no sangue foram utilizados 20 ratos distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 5 ratos cada. Três grupos foram, respectivamente, tratados com aspirina (30 mg/kg;Sigma), ticlopidina (300 mg/kg;Sigma) e clopidogrel (25mg/Kg). via gavagem, diariamente, dose única, por 15 dias. Um grupo serviu como controle e foram tratados diariamente com solução salina (NaCl 0,9%), como os mesmos procedimentos utilizados nos grupos anteriores.

Após o período experimental de 15 dias os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia geral através de injeção intra-peritoneal de 0,08 ml/100g de peso corporal de ketamina (Francotar®, Virbac, São Paulo, Brazil) e 0,04 ml/100g de peso corporal de Cloridrato de Xylazina (Virbaxil®, Virbac), e 3

mL de sangue foram coletados através de punção cardíaca com auxílio de um tubo a vácuo com anticoagulante k3EDTA (Vacuette Greiner ®). A contagem de plaquetas e de leucócitos foi realizada em um contador eletrônico T.890 (Coulter®) em até 2 horas após a coleta.

### 6.3 Indução da doença periodontal experimental

Quarenta ratos foram submetidos à anestesia através de injeção intraperitoneal de 0,08 ml/100g de peso corporal de ketamina (Francotar®, Virbac, São Paulo, Brazil) e 0,04ml/100g de peso corporal de cloridrato de Xylazina (Virbaxil®, Virbac).

Após anestesia geral um fio de algodão nº30 estéril foi então colocado subgingivalmente em volta do primeiro molar inferior direito e esquerdo de cada rato para indução de periodontite experimental (Figuras 2). Esta ligadura atuou como irritante gengival, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana<sup>35</sup>. O período de permanência da ligadura foi de 15 dias. Esse período foi representativo para instalação da doença.

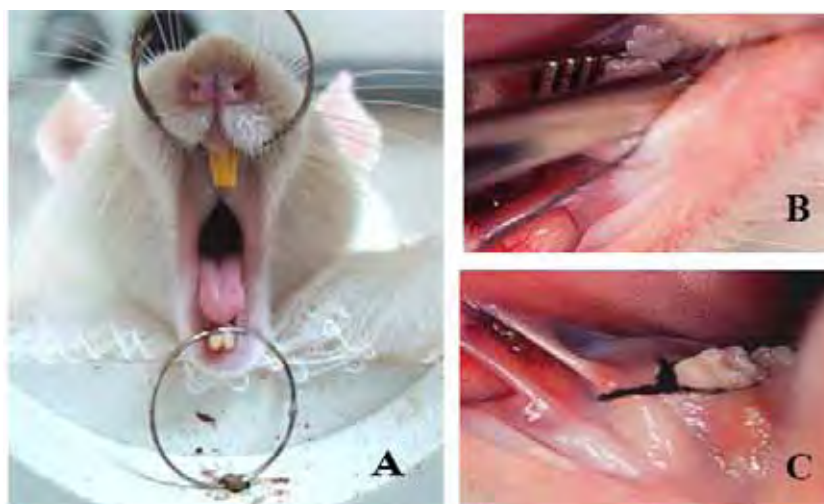


FIGURA 2 -(a) posicionamento do animal em mesa apropriada para colocação da ligadura. (b) Colocação da ligadura com auxílio de uma pinça. (c) Ligadura posicionada no primeiro molar inferior.

#### 6.4 Avaliação do efeito da aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a evolução da doença periodontal

Para a avaliação da inibição da ativação plaquetária induzida pela aspirina, ticlopidina e clopidogrel sobre a evolução da doença periodontal inflamatória, foram utilizados 50 ratos separados aleatoriamente em 5 grupos de 10 animais cada (tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de ratos submetidos ou não a periodontite e aos tratamentos com aspirina, ticlopidina ou clopidogrel por um período de 15 dias

Grupos (n=10)	Procedimento
1	Controle
2	Indução da Periodontite
3	Indução da Periodontite e tratado com Aspirina
4	Indução da Periodontite e tratado com Ticlopidina
5	Indução da Periodontite e tratado com Clopidogrel

#### 6.5 Tratamento com aspirina, ticlopidina e clopidogrel

A partir do 1<sup>o</sup> dia da instalação da ligadura, os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram tratados diariamente com as drogas, nos mesmos padrões citados no item 6.2. Os ratos dos grupos 1 e 2 foram tratados diariamente com solução Salina (NaCl 0,9%), também nos mesmos padrões citados no item 6.2. Após o período experimental estabelecido para a indução da doença periodontal, os animais foram

sacrificados por aprofundamento da anestesia e, em sequência, realizada a obtenção das amostras.

### **6.6 Obtenção das amostras e delineamento experimental**

As hemimandíbulas do lado esquerdo dos animais sacrificados foram fixadas em formol tamponado (pH 7,2) 10% durante aproximadamente 48 horas. Em seguida as hemimandíbulas foram imersas em solução descalcificadora constituída de solução de EDTA (0,5M, pH 7.8) a temperatura ambiente e trocada três vezes por semana por um período de três meses. Após a descalcificação, as hemimandíbulas foram lavadas em água corrente por 24 horas, seguindo-se do processo de desidratação que consistiu em banhos sucessíveis, com duração de uma hora cada, de álcool 70, 90 e absoluto, sendo que com este último foram realizados seis banhos. Em sequência, realizou-se o processo de diafanização no qual as peças passaram por banhos sucessíveis, também de uma hora cada, de álcool/xilol (em partes iguais) e de xilol puro, neste último dois banhos foram realizados. Para remover o excesso de xilol, envolveram-se os “cacetes” com papel absorvente e em seguida as peças foram imersas em banho de parafina líquida a 60°C por uma hora.

Então, quando as peças estavam livres de qualquer resíduo de xilol, foram submetidas a um segundo banho de parafina líquida pura a 60°C e mantidas imersas nesta em uma estufa a vácuo por duas horas. Após esse período foram confeccionados os blocos e cortes de 5µm foram então obtidos com auxílio de um micrótomo rotativo (Spencer 820®, American Optical) através de cortes seriados no sentido vestibulo-lingual (em plano frontal).

Os tecidos mucogengivais circundantes aos molares inferiores direito foram removidos e a partir dessas amostras determinou-se, através de testes imunoenzimáticos, a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA2.

### **6.7 Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA2**

A dosagem de proteínas totais nos homogenatos foi realizada de acordo com o método de Bradford <sup>11</sup> (Kit comercial Bio Rad, EUA), utilizando-se como padrão uma curva de albumina diluída em água destilada com concentrações compreendidas entre 2,5 e 50 ug/ml (em duplicata). As amostras foram devidamente diluídas em água destilada e para cada uL de padrão ou amostra, foram adicionados 50 uL do reagente Comassie Blu. Após incubação de 5 min a temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram realizadas a 595 nm.

### **6.8 Análise Histológica**

As lâminas foram analisadas para observação dos seguintes parâmetros: intensidade de celularidade (processo inflamatório) e quantidade e distribuição de fibras colágenas. Esta análise foi realizada, por avaliador calibrado e cego, em pelo menos 4 cortes de cada um dos espécimes correspondentes a cada grupo experimental. Para comparações entre os grupos duas avaliações quantitativas dos cortes analisados foram feitas, uma quantificando a celularidade e outra quantificando fibras colágenas. Essas avaliações foram feitas através de dois escores:

- Escore 1: Avaliação da quantidade de células inflamatórias. Composto por valores de 0 a 3, onde o aumento no valor do escore representa também um aumento na celularidade.



FIGURA 3 – Figura representativa do escore utilizado para análise da celularidade após período experimental.

- Escore 2: Avaliação da quantidade de fibras colágenas. Composto por valores de 0 a 3, onde o aumento no valor do escore representa maior quantidade de fibras colágenas



FIGURA 4 - Figura representativa escore utilizado para quantificação de fibras colágenas após período experimental. Fibras colágenas representadas em azul.

A determinação da reabsorção óssea (altura) foi quantificada através da distância linear ( $\mu\text{m}$ ) da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar (COA) nas raízes mesio-vestibulares (Figura 2). Esta análise foi realizada em pelo menos 9 cortes para cada um dos espécimes por um único avaliador calibrado e cego, e as medidas determinadas através de software (UTHSCSA Image Tool for Windows, version 3.00) em fotos obtidas por microscopia ótica (Olympus BX51, Japan) acoplado à câmera digital (Olympus Camedia 5060, Japan).



FIGURA 5 – Imagem histológica utilizada para mensuração das medidas lineares ( $\mu\text{m}$ ) da JCE-COA.

### 6.9 Análisa Estatística

Testou-se previamente a reprodutibilidade intra-examinador (coeficiente de correlação intraclass- alfa de Cronbach). A comparação das variáveis quantitativas da análise foi realizada com a análise de variância de dois critérios (ANOVA two way) e pós-teste de Bonferroni. Testou-se a distribuição dos dados com o Teste de Shapiro Wilks, a equivalência das variâncias foi conduzida com o Teste de Levene. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%. A realização de todos os cálculos se deu pelo uso dos softwares SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) version 11.5.1 for Windows (SPSS Inc. Chicago Illinois- USA) e InStat version 3.0 for Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego- USA).

## 7. Resultados

### 7.1 Avaliação do peso e aspectos gerais dos animais

Durante o período experimental, os animais não apresentaram alterações comportamentais. A pelagem manteve-se com aspecto de normalidade e não foram encontradas lesões na mucosa bucal. Os animais foram pesados regularmente e apresentaram ganho de peso dentro dos padrões de normalidade (Figura 6). No 12º dia de experimento houve perda de um animal do grupo ticlopidina.

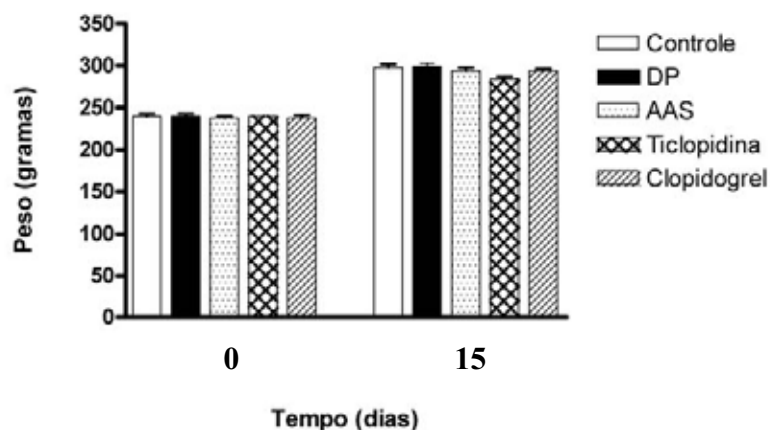


FIGURA 6 - Variação do peso corporal(g) entre o início do experimento (dia 0) e após 15 dias de indução de doença periodontal experimental. Não houve variação significativa entre os pesos corporais dos animais envolvidos. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 7.2 Avaliação da quantidade de plaquetas e leucócitos circulantes no sangue de ratos tratados com aspirina (30 mg/kg), ticlopidina (300 mg/kg) e clopidogrel (75 mg/kg)

Após 15 dias de tratamento com drogas antiagregantes não foram observadas alterações no número de plaquetas circulantes no sangue dos animais (Figura 7). Os ratos tratados com 30 mg/kg de aspirina apresentaram aumento significativo no número de leucócitos circulantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 8). Esses dados



sugerem a ausência de aplasia medular induzida pelas drogas, visto que os hemogramas dos animais não apresentaram sinais de pancitopenia.

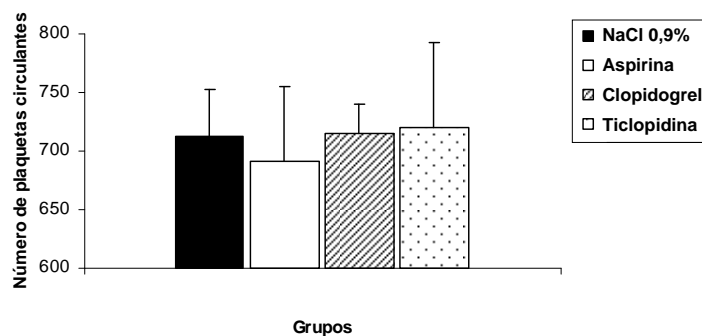


FIGURA 7 - Quantidade de plaquetas circulantes de ratos após 15 dias de tratamento com NaCl 0,9%, aspirina (30 mg/kg), ticlopidina (300 mg/kg) e clopidogrel (75 mg/kg) Valores expressos em média ± desvio padrão ( $p > 0,05$ ).

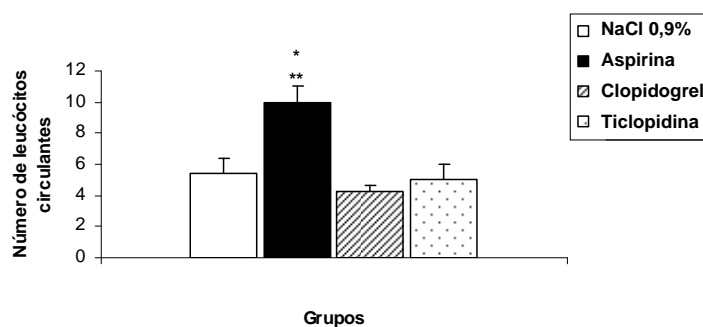


FIGURA 8 - Quantidade de leucócitos circulantes após 15 dias de tratamento com NaCl 0,9%, aspirina (30 mg/kg), ticlopidina (300 mg/kg) e clopidogrel (75 mg/kg). Valores expressos em média ± desvio padrão (\*  $p < 0,05$  vs salina; \*\*  $p < 0,01$  vs clopidogrel e ticlopidina).

### 7.3 Análise da concentração de citocinas

O grupo DP apresentou valores de TNF-  $\alpha$  significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) em relação aos demais grupos. Os grupos tratados com drogas antiagregantes apresentaram valores menores quando comparados à DP ( $p < 0,001$ ). Quando comparados ao controle, esses grupos também apresentaram menor expressão de TNF-  $\alpha$ , porém sem significância estatística. As diferenças estatísticas entre os grupos estão apresentadas na Figura 9.

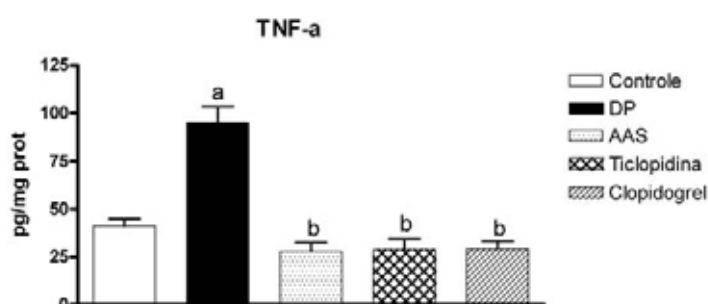


FIGURA 9 – Expressão de TNF-  $\alpha$  após período experimental. (a)  $p < 0,001$  vs controle – ANOVA. (b)  $p < 0,001$  vs DP – ANOVA. Notar menor quantidade de citocinas nos grupos tratados com drogas antiagregantes. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Semelhante ao TNF-  $\alpha$ , a IL-6 mostrou-se mais expressa no grupo DP, apresentando valores significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) em relação aos demais grupos. Os grupos tratados com drogas antiagregantes apresentaram valores menores quando comparados à DP ( $p < 0,01$ ). Quando comparados ao controle, esses grupos também apresentaram menor expressão de IL-6, porém sem significância estatística. As diferenças estatísticas entre os grupos estão apresentadas na Figura 10.

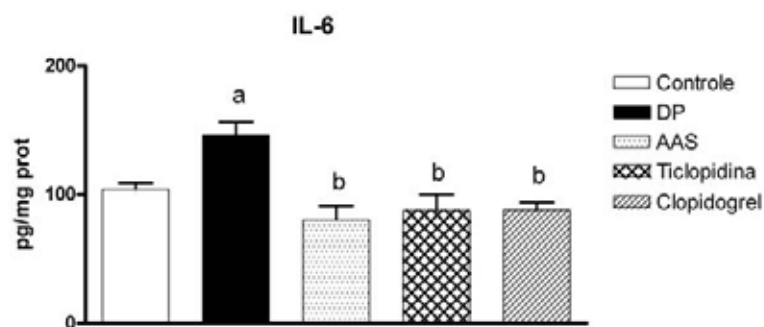


FIGURA 10 – Expressão de IL-6 após período experimental. (a)  $p < 0,01$  vs controle – ANOVA. (b)  $p < 0,01$  vs DP – ANOVA. Notar menor quantidade de citocinas nos grupos tratados com drogas antiagregantes. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

O grupo DP apresentou valores de TXA2 significativamente maiores em relação aos grupos controle ( $p < 0,01$ ), AAS e ticlopidina ( $p < 0,001$ ). O grupo tratado com clopidogrel, apesar de apresentar menor quantidade de TXA2, quando comparado a DP não apresentou valores estatisticamente significantes. Quando comparados ao controle, os grupos AAS e ticlopidina apresentaram menor expressão de TXA2, porém também sem significância estatística. As diferenças estatísticas entre os grupos estão apresentadas na Figura 11.

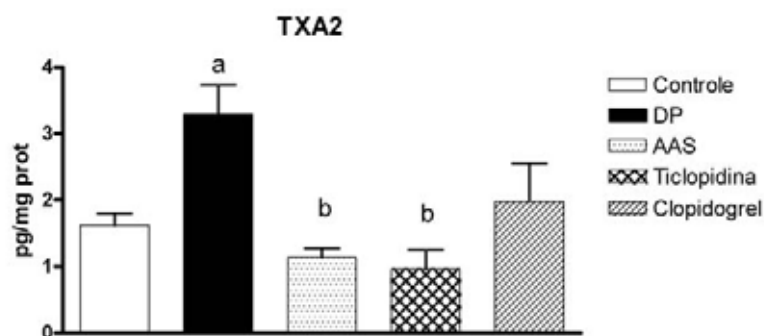


FIGURA 11 – Expressão de TXA2 após período experimental. (a)  $p < 0,01$  vs controle – ANOVA. (b)  $p < 0,001$  vs DP – ANOVA. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## **7.4 Análise histológica**

### **7.4.1 Análise descritivas das alterações histológicas**

O periodonto do primeiro molar inferior dos animais que não foram submetidos à ligadura (Grupo Controle) apresentou gengiva vestibular formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com exceção da porção que participava da junção dentogengival. Entre as células do epitélio juncional, havia pequeno número de neutrófilos e o corion gengival subjacente apresentava infiltrado inflamatório, com neutrófilos como leucócitos predominantes. O ligamento periodontal e o septo ósseo estavam íntegros.

O tecido epitelial da face vestibular dos animais submetidos à ligadura apresentaram-se com reabsorção dos feixes de fibras colágenas e apresentaram intenso infiltrado de células inflamatórias. Na porção mais superior, observou-se polimorfonucleares e, na mais inferior, mononucleares e figuras vasculares. O tecido ósseo estava reabsorvido com exposição radicular sobre o epitélio (Figura 12). Alguns animais apresentaram severa reabsorção resultando em avulsão dental (Figura 13).



FIGURA 12 – Fotomicrografia ilustrando características histopatológicas dos tecidos periodontais, 15 dias após colocação de ligadura, mostrando intensa reabsorção óssea com exposição radicular sobre o epitélio no grupo DP (Aumento de 4X, H&E).

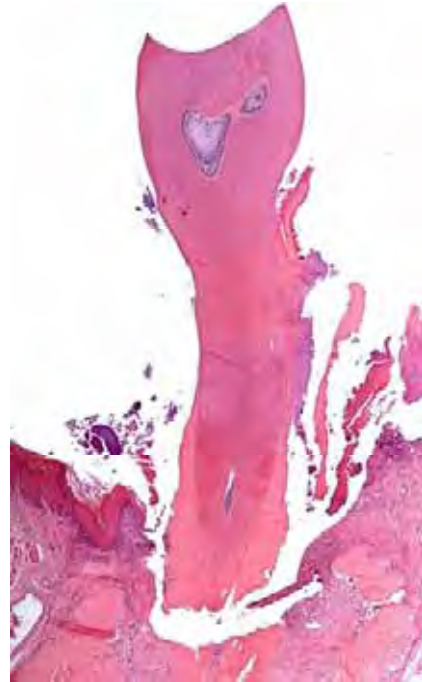


FIGURA 13- Fotomicrografia ilustrando avulsão dental resultante da severa reabsorção óssea no grupo DP (Aumento 4x, H&E).

Os animais tratados com AAS, ticlopidina e clopidogrel, apesar de apresentarem características ósseas e celulares de inflamação, apresentaram como diferencial um maior número de fibras colágenas distribuídas de forma mais organizada quando comparadas à doença periodontal. Observou-se processo inflamatório principalmente na região superior da lesão seguido por um estroma mais fibroso e organizado quando comparado ao grupo DP (Figuras 14, 15, 16, 17 e 18). Esses dados sugerem um abreviamento do processo inflamatório. Nesta análise, os derivados tienopiridínicos mostraram maior potência anti-inflamatória em relação a aspirina.

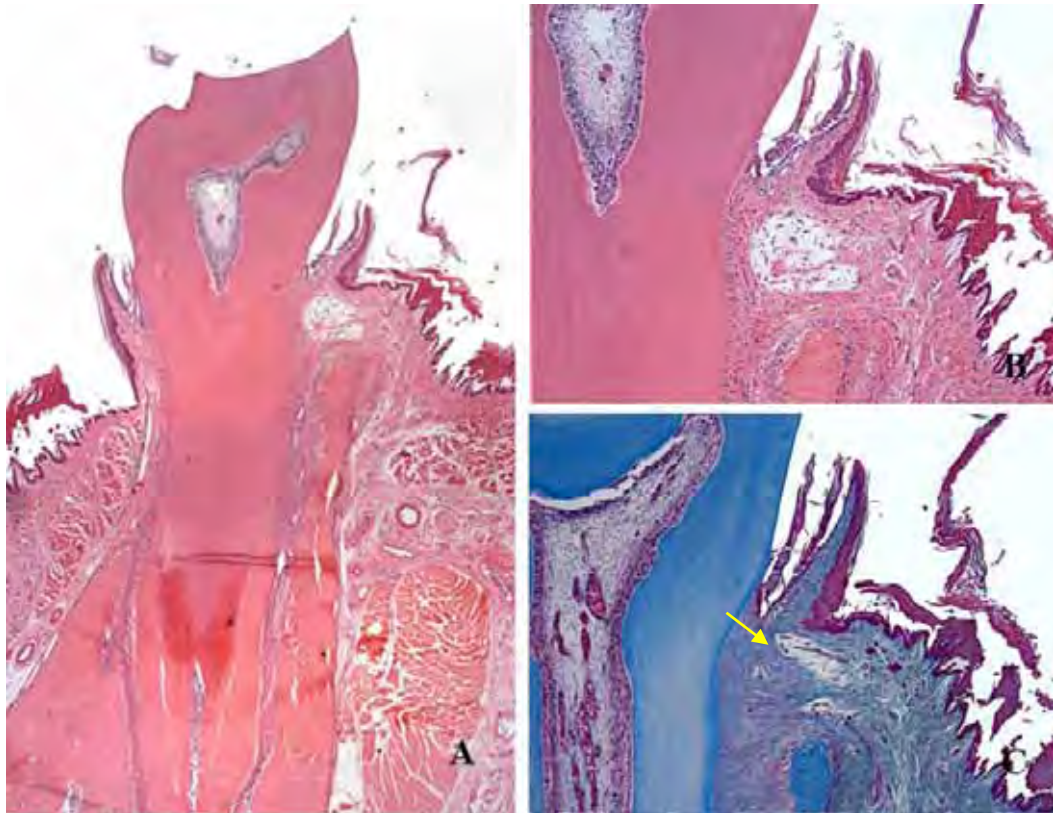


FIGURA 14- (A) Fotomicrografia ilustrando as características de normalidade do periodonto do primeiro molar inferior não submetido à indução de DP (Aumento 4X, H&E). (B) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando área dento-gengival saudável (H&E). (C) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando fibras colágenas distribuídas de forma organizada ( ) (Tricrômio de Masson).

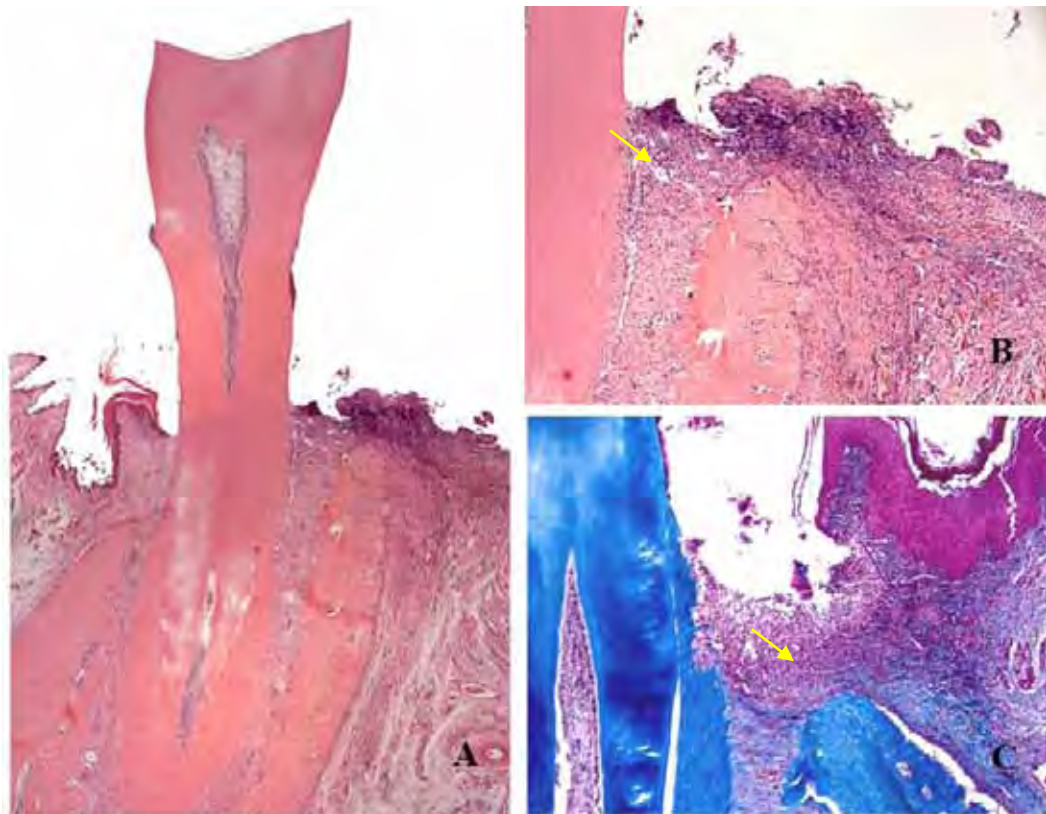


FIGURA 15– (A) Fotomicrografia ilustrando as características histopatológicas do periodonto do primeiro molar inferior, 15 dias após indução de DP, mostrando epitélio retraído, desorganizado e celularizado (Aumento 4X, H&E). (B) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando intenso infiltrado inflamatório e figuras vasculares ( ) (H&E). (C) Aumento de 10X da região vestibular da figura A evidenciando escassez de fibras colágenas distribuídas de forma desorganizada ( ).

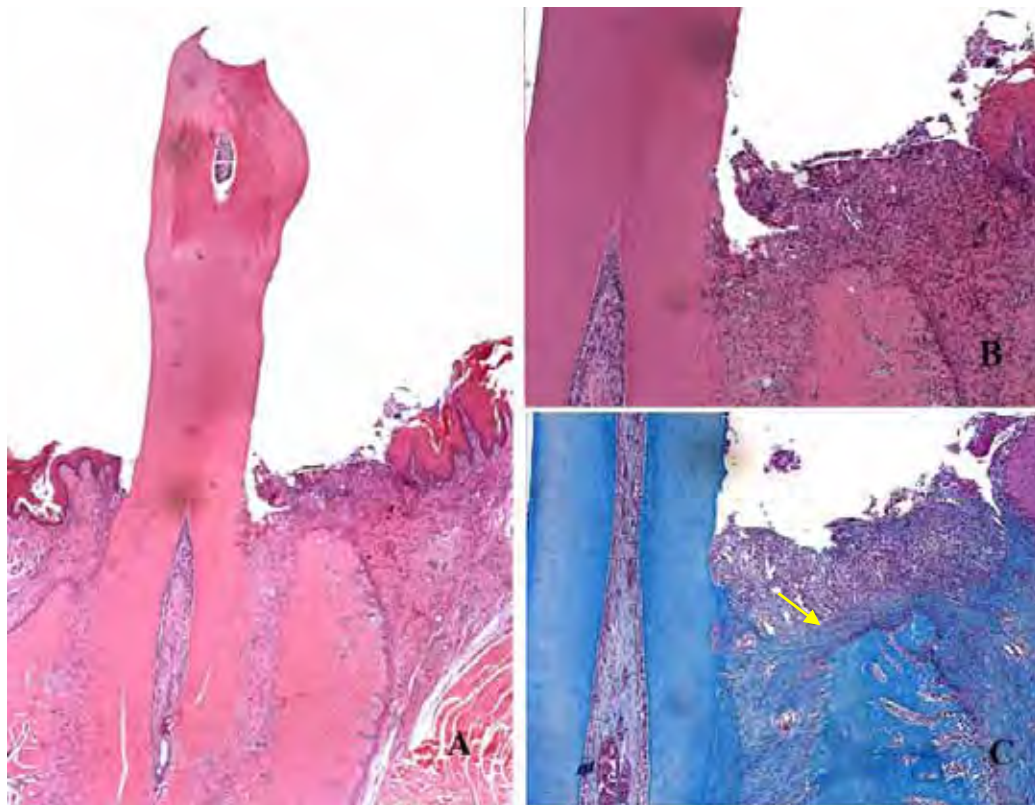


FIGURA 16 - (A) Fotomicrografia ilustrando as características histopatológicas do periodonto do primeiro molar inferior, 15 dias após indução de DP e administração de AAS, mostrando epitélio retraído, desorganizado e celularizado (Aumento 4X, H&E). (B) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando intenso infiltrado inflamatório e figuras vasculares (H&E). (C) Aumento de 10X da região vestibular da figura A evidenciando estroma fibroso mais organizado quando comparado ao grupo DP ( ) (Tricômio de Masson).





FIGURA 17- (A) Fotomicrografia ilustrando as características histopatológicas do periodonto do primeiro molar inferior, 15 dias após indução de DP e administração de ticlopidina, mostrando epitélio retraído, desorganizado e celularizado (Aumento 4X, H&E). (B) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando intenso infiltrado inflamatório e figuras vasculares (H&E). (C) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, evidenciando estroma fibroso mais organizado e com maior quantidade de fibras quando comparado ao grupo DP e AAS ( ) (Tricrômio de Masson).

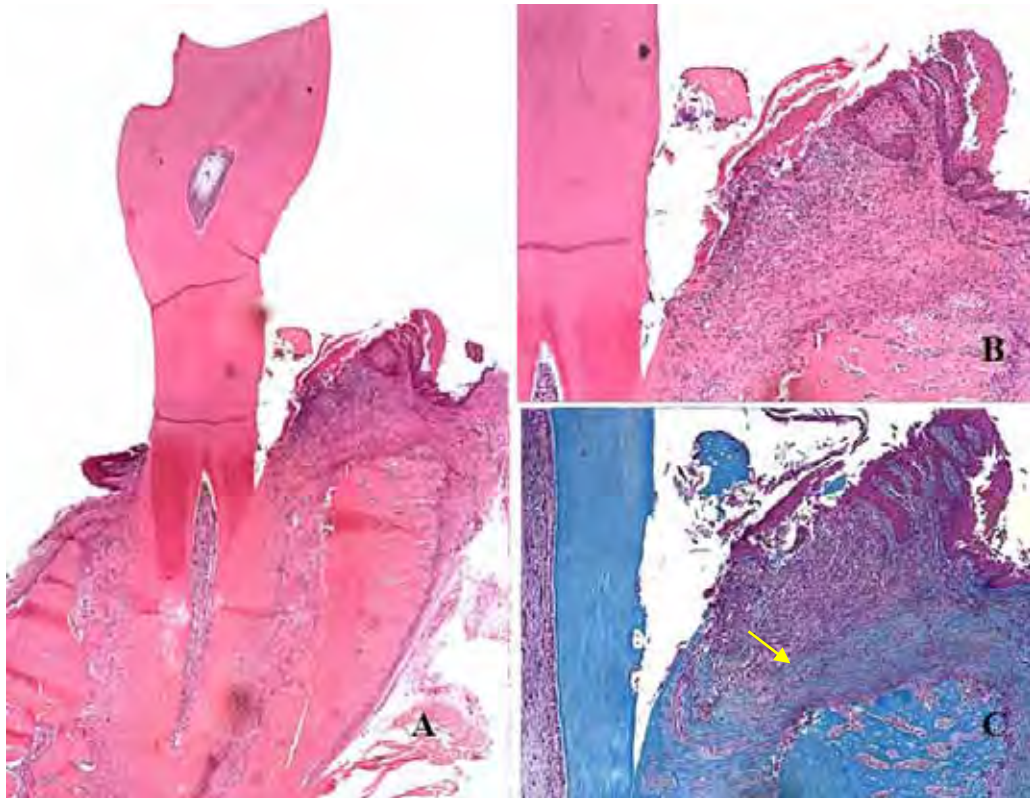


FIGURA 18 – (A) Fotomicrografia ilustrando as características histopatológicas do periodonto do primeiro molar inferior, 15 dias após indução de DP e administração de clopidogrel, mostrando epitélio retraído, desorganizado e celularizado (Aumento 4X, H&E). (B) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, mostrando intenso infiltrado inflamatório e figuras vasculares (H&E). (C) Aumento de 10X da região vestibular da figura A, evidenciando estroma fibroso mais organizado e com maior quantidade de fibras quando comparado ao grupo DP e aos demais grupos tratados com drogas ( ) (Tricrômio de Masson).

Para cada grupo experimental (controle, DP, AAS, ticlopidina e clopidogrel) foram obtidas as médias dos escores (descritos anteriormente) das alterações patológicas encontradas na face vestibular envolvendo epitélio e conjuntivo dos primeiros molares inferiores envolvidos. Os resultados encontrados estão dispostos nas Figuras 19 e 20. O grupo controle apresentou pequena quantidade de células inflamatórias distribuídas de forma espaçada pelo tecido. Nos grupos submetidos à indução de doença periodontal verificou-se um aumento significativo da celularidade na região da lesão. Os animais dos grupos tratados com drogas antiagregante apresentaram menor número de células inflamatórias e maior quantidade de fibras colágenas quando comparados aos do grupo controle.

Em análise comparativa dentre os grupos tratados com drogas antiagregantes, os animais do grupo clopidogrel apresentaram menor número de células inflamatórias e maior quantidade de fibras colágenas, seguindo-se dos grupos ticlopidina e AAS.

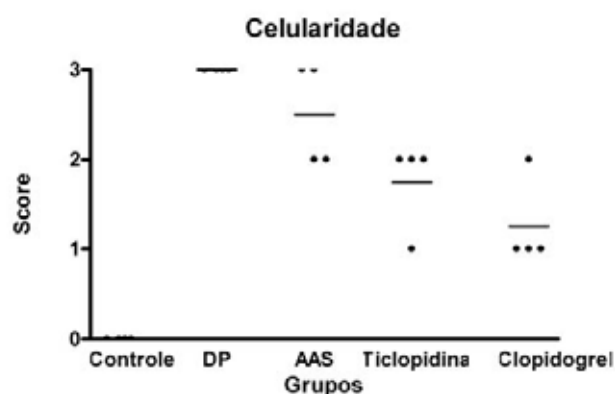


FIGURA 19 – Distribuição de células inflamatórias no tecido suprajacente à crista óssea alveolar. Notar menor quantidade de células nos grupos tratados com tienopiridídicos. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

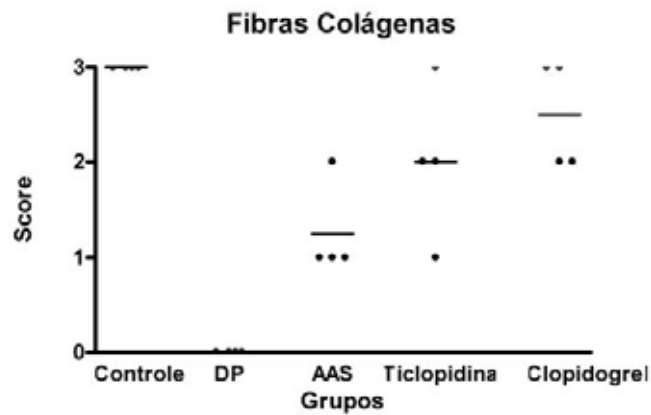


FIGURA 20 – Quantidade e distribuição de fibras colágenas no tecido suprajacente à crista óssea alveolar. Notar maior quantidade de fibras nos grupos tratados com tienopiridídicos. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 7.4.2 Análise quantitativa da reabsorção óssea

As distâncias lineares (em micrômetros) da JCE à crista óssea alveolar (representativas da reabsorção óssea), observadas nas raízes mesio vestibulares dos molares inferiores de cada grupo experimental, foram determinadas e avaliadas em ambas as faces, vestibular e lingual. Na face vestibular observou-se menor reabsorção óssea nos grupos tratados com drogas antiagregantes quando comparados ao grupo DP, porém somente os grupos tienopiridínicos mostraram-se estatisticamente significantes. Na face lingual não foram observadas diferenças significativas. A média e o desvio padrão de cada grupo experimental, bem como as diferenças estatísticas entre os mesmos estão apresentados nas Figuras 21 e 22.

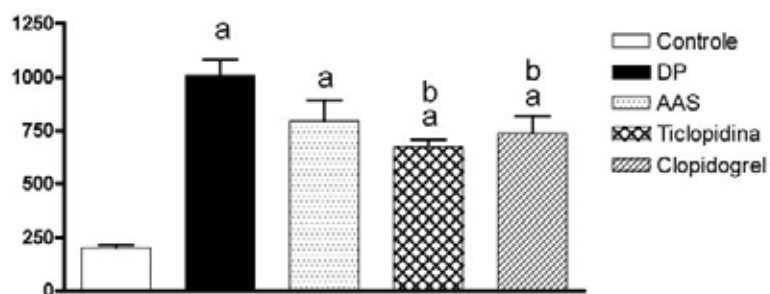


FIGURA 21- Reabsorção óssea vestibular representada pela distância linear ( $\mu\text{m}$ ) da JCE à crista óssea alveolar na face vestibular do osso alveolar. (a)  $p < 0,001$  vs controle - ANOVA. (b)  $p < 0,01$  vs DP - teste t. Notar menor quantidade de reabsorção óssea nos grupos tratados com tienopiridínicos (ticlopidina e clopidogrel) sugerindo efeito antiinflamatório dessas drogas no desenvolvimento da DP. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

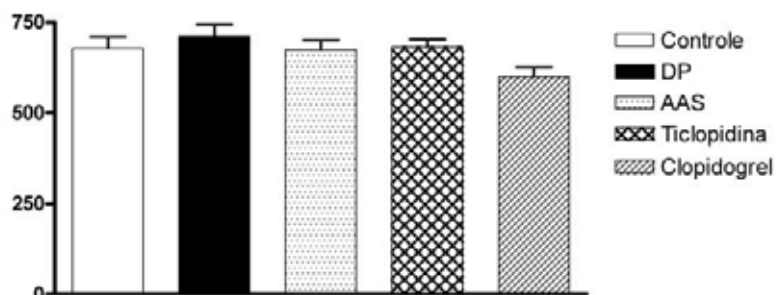


FIGURA 22- Reabsorção óssea lingual representada pela distância linear ( $\mu\text{m}$ ) da JCE à crista óssea alveolar na face lingual do osso alveolar. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 8. Discussão

As reações inflamatórias e imunológicas ao biofilme dental representam características predominantes da gengivite e periodontite. A reação inflamatória é visível, microscópica e clinicamente, no periodonto afetado e corresponde à reação do hospedeiro a microbiota do biofilme e seus produtos, podendo ser induzida em ratos de forma reproduzível<sup>29,30,53</sup>.

De fato, o modelo experimental de indução da doença periodontal em ratos utilizado neste trabalho é bem estabelecido e aceito na literatura pertinente, e modelos experimentais semelhantes já foram utilizados em variadas espécies<sup>35,54</sup>. Neste modelo, a ligadura age tanto como desencadeador da formação do biofilme dental quanto como trauma mecânico na área dento-gengival, provocando achatamento e deslocamento dos tecidos, e reduzindo a integridade tecidual, permitindo intensa interação hospedeiro/biofilme dental. A iniciação da doença periodontal por bactérias é bem documentada e o resultado final, que envolve destruição do osso alveolar e de outros tecidos conjuntivos, é prontamente observado<sup>9,35,43</sup>. Entretanto, verificou-se que a periodontite foi mais exacerbada na porção mesiovestibular e área de furca do dente envolvido. Esse fato pode ser explicado pela ação mecânica de limpeza da língua do animal, resultando em menor quantidade de biofilme na face lingual.

Está bem estabelecido que o desenvolvimento da doença periodontal se caracteriza pela presença de complexa rede de citocinas, as quais podem ter efeitos autócrinos ou parócrinos, podendo modular sua própria expressão ou a expressão de outras citocinas<sup>57</sup>. Durante a patogênese da doença periodontal inflamatória ocorre ativação plaquetária que, por sua vez, pode amplificar a inflamação. Uma variedade de potentes fatores de crescimento e citocinas são estocados nas plaquetas e liberados durante sua ativação. Plaquetas são parte integrante de uma intrincada rede de células e produtos celulares que participam ativamente do desenvolvimento do processo inflamatório. Entretanto, sua importância na inflamação não está somente ligada à produção de fatores

inflamatórios, mas também à ação reguladora no processo de recrutamento de leucócitos<sup>57,84</sup>.

O presente estudo investigou se a inibição da ativação plaquetária por drogas pode alterar o desenvolvimento da doença periodontal, visto que estudos recentes indicaram um aumento na ativação plaquetária em pacientes com periodontite quando comparados a controles saudáveis<sup>57</sup>.

Drogas antiagregantes plaquetárias são responsáveis por inativar funções plaquetárias, tais como adesividade, agregação e reação de liberação, evitando assim a formação do trombo, sobretudo em doenças cardiovasculares. Diversos fármacos são utilizados com este fim, com diferentes mecanismos de ação<sup>4,22</sup>. Para induzir inativação plaquetária, neste trabalho, foram utilizadas três drogas antiagregantes: aspirina (AAS) e duas outras drogas derivadas da tienopirina, ticlopidina e clopidogrel. Essas drogas são utilizadas em larga escala e inibem a ativação plaquetária por diferentes mecanismos de ação. As dosagens utilizadas nesse experimento são bem estabelecidas na literatura e confirmou-se, em nossas análises, não haver trombocitopenia (diminuição no número de plaquetas) nem leucopenia (diminuição no número de leucócitos) com essas dosagens (Figuras 7 e 8).

Nossos resultados mostraram que os animais tratados com drogas antiagregantes apresentaram níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e TXA2 menores quando comparados aos animais do grupo DP. É bem estabelecido que essas citocinas são importantes no desenvolvimento da doença periodontal<sup>5,6,49,51,31</sup>. Nós podemos aventar a hipótese de que a inativação de plaquetas por drogas impede a liberação de fatores ativadores derivados de plaquetas (PAF), responsáveis por estimular monócitos, macrófagos e células endoteliais a secretar IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>26,28,64</sup>. Assim, sabendo-se que essas citocinas estão envolvidas na resposta imune Th1<sup>6</sup>, esse evento provoca alterações na resposta humoral celular conforme observado no quadro histológico. É importante salientar que as plaquetas, diferindo-se de demais células reservatórias de citocinas, além de conter esses mediadores,

também estimulam macrófagos que têm capacidade de aumentar a síntese de algumas citocinas em até 10.000 vezes<sup>28,78</sup>.

Entre os tienopiridínicos apenas o grupo tratado com ticlopidina apresentou redução de TXA2 estatisticamente significativa, embora tratamento com clopidogrel também tenha apresentado tendência em diminuir a concentração de TXA2, quando comparados ao grupo DP. Esse resultado pode estar relacionado ao mecanismo de ação dessas drogas. A ticlopididina e o clopidogrel são inibidores seletivos da adenosina difosfato (ADP) e bloqueadores parciais dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa, não tendo efeito direto no metabolismo do ácido aracdônico e, conseqüentemente, na produção de TXA2<sup>60,62</sup>. Assim, diferentemente do AAS, que inibe irreversivelmente a ciclooxigenase 1 (COX1) impedindo a formação de PGE-H2 e, portanto, de TXA2<sup>60,63</sup>, o efeito supressor de TXA2 dessas drogas ocorre indiretamente por mecanismos ainda não esclarecidos, visto que são drogas relativamente novas quando comparadas ao AAS.

Os grupos experimentais submetidos à ligadura apresentaram características histopatológicas compatíveis com doença periodontal, porém, os grupos tratados com tienopiridínicos apresentaram sinais de inflamação de forma mais tênue quando comparados ao grupo DP, o que pode ser explicado pela diminuição dos mediadores inflamatórios verificados (TNF- $\alpha$ , IL-6 e TXA2). Fato importante observado em nosso estudo foi a conservação de uma matriz extracelular rica em fibras colágenas nos grupos tratados com drogas antiagregantes. De fato, nesses grupos, diferentemente do grupo DP, observou-se maior número de fibras, distribuídas de forma mais organizada. Isso se deve ao fato de que, com a inativação plaquetária, obtivemos uma diminuição nos níveis de interleucinas, citocinas que estimulam a produção de colagenase<sup>19,26,64</sup>. E além disso, a inativação de plaquetas também resulta em diminuição de neutrófilos (via PAF), que contém em seu interior grânulos lisossomias onde estão presentes enzimas (elastase, colagenase e catepsina G) que, quando liberadas, causam destruição tecidual<sup>84</sup>.



Esses dados sugerem uma abreviação do processo inflamatório indicando o potencial anti-inflamatório das drogas utilizadas. Baseado neste parâmetro, das três drogas avaliadas o clopidogrel foi a que mostrou maior ação anti-inflamatória, seguido da ticlopidina e AAS.

Na avaliação da quantidade de reabsorção óssea, embora todos os grupos tratados com antiagregantes tenham apresentados menores valores de reabsorção, apenas nos derivados tienopiridínicos essa redução foi significativa. Isso se deve ao fato de que para que ocorra reabsorção óssea na periodontite é necessário que precursores dos osteoclastos sejam recrutados para a área do osso perialveolar<sup>1,77</sup>. Esse recrutamento é feito por citocinas, dentre elas IL-1, IL-6, IL-3 e TNF- $\alpha$ <sup>9,40,45,82</sup>, diminuídas pelas drogas estudadas. Somado a isso, a presença de TNF- $\alpha$ , além de estimular osteoclastogênese, inibe a formação óssea<sup>77</sup>. Assim, o efeito supressor da reabsorção óssea das drogas antiagregantes, sobretudo dos derivados tienopiridínicos, pode estar associado ao fato de que a inativação plaquetária bloqueia a liberação de PAF, fator ativador responsável por estimular macrófagos a produzirem IL-6 e TNF- $\alpha$  em larga escala, citocinas importantes no processo de recrutamento osteoclástico<sup>26,64</sup>.

Como demonstrado anteriormente, estudos sobre a associação entre plaquetas e progressão da doença periodontal ainda são muito recentes e inconclusivos. Contudo, as evidências indicam a forte relação entre ativação plaquetária e periodontite. Dessa forma, acreditamos que frente aos resultados obtidos, a inativação plaquetária poderá vir exercer uma importante opção como terapia anti-inflamatória coadjuvante.

## **9. Conclusão**

Com base nos resultados deste trabalho, conclui-se que:

1) A administração de antiagregantes interferiu no processo inflamatório periodontal reduzindo a expressão de TNF-  $\alpha$ , IL-6 e TXA2.

2) A terapia antiagregante, sobretudo com tienopiridínicos, abreviou o processo inflamatório e, conseqüentemente, a doença periodontal experimental.

## 10. REFERÊNCIAS \*

1. Ai-Agl ZS, Al-Agl AS, Graves, DT, Gerstenfeld, LC, Einhorn, TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87: 2008; 87: 107-18.
2. Ashida SI, Abiko Y. Mode of action of ticlopidine in inhibition of platelet aggregation in the rat. *Thromb Haemost.* 1979; 4187: 107-18.
3. Aukrust P, Waehre T, Damas, JK, Gullestad L, Solum NO. Inflammatory role of platelets in acute coronary syndromes. *Heart (British Cardiac Society)* 2001;86: 605-6.
4. Batlouni M. *Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular*, São Paulo: Ateneu, 1999.
5. Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol.* 1998; 3: 127-41.
6. Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptative antitumor immunity. *T Immunol.* 2002; 23: 201-8.
7. Bennet CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Eng. J Med*, 2000; 342: 1773-7.
8. Bennett JS. Novel Platelet Inhibitors. *Annu Rev Med.* 2001; 52: 161-84.
9. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1009-14.
10. Bernardini G; Ribatti D; Spinetti G; Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, et al.. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.* 2003; 273: 83-101.

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7: 248-54.
12. Carlos MML; Freitas PDDS. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Vet Bras.* 2007; 1: 49-55.
13. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2002; 133: 1383-6.
14. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9: 653-60.
15. Carranza FA, Newman MG, Takei H, Klokkevold PR. *Periodontia clínica.* 10.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.1328p.
16. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Sakallioglu EE, Acikgoz G. The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol.* 2007; 78: 1129-35.
17. Chen YG, Xu F, Zhang Y, Ji QS, Sun Y, Lu RJ, et al. Effect of aspirin plus clopidogrel on inflammatory markers in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Chin Med J.* 2006; 119: 32-6.
18. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 157-64.
19. Cohen DW, Slavkin HC. Periodontal disease and systemic disease. In: *Periodontal Medicine*, Eds. Rose LF, Genco RJ, Cohen DW, Mealey BL, B.C. Decker Inc., Hamilton, Canada 2000; 1-10.
20. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 507-21.

21. Corry DB, Rishi K, Kanellis J, Kiss A, Song LZ, Xu J et al .Decrease allergic lung inflammatory cell egression and increasedsusceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nat Immunol.* 2000; 3: 347-53.
22. Couto AA. *Farmacologia Cardiovascular aplicada à clínica.* 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 1072p.
23. D'aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. *Am Heart J.* 2006; 151: 977–84.
24. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, SOLUM NO, et al. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation.* 2003; 107: 2670-6.
25. Dhanabal M; Ramchandran R; Volk R; Stillman IE; Lombardo M; Iruela-Arispe ML; et al. Endostatin: yeast production, mutants, and anti-tumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 189- 97.
26. Dinarello CA, Moldawer LL. *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid antritis-1.* Amgen, Inc One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA. 1999.
27. Falcinelli E, Guglielmini G, Torti M, Gresele P. Platelets release matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in vivo in humans at a localised site of platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2526–35.
28. Gaumoud F, Fortin D, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Differential signaling pathways in platelet-activating factor-induced proliferation and interleukin-6 production by rat vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997; 30: 169–75.

29. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 17-34.
30. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 14-40
31. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 1046-52.
32. Herzberg MC, Weyerm W. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 151–60.
33. Hoeben A; Landuyt B; Highley MS; Wildiers H, Van Oosterom AT, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 549-80.
34. Jiang MC; Liao CF; Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282: 671-77.
35. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res.* 1975; 10: 332- 45.
36. Kereiakes DJ. Adjunctive pharmacotherapy before percutaneous coronary intervention in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the role of modulating inflammation. *Circulation.* 2003; 108 Suppl1: III22-7.
37. Kereiakes D.J., The fire that burns within: C-reactive protein, *Circulation.* 2003; 107: 373–74.
38. Klausen, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991; .62: 59-73.

39. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 913–22.
40. Kumar V; Cotran RS; Schoen FJ. *Robbins: patologia estrutural e funcional.* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
41. Linder BL, Chernoff A, Kaplan KL, Goodman DS. Release of platelet-derived growth factor from human platelets by arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sc.* 1997; 76: 4107–11.
42. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2005.
43. LohinaI Z, Benedek P, Feher E, Goyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, et al. Protective effects o mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in rat. *British journal of pharmacology* 1998; 123: 353-60.
44. Lourbakos A, Yuan Y, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, et al. Activation of proteaseactivated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 2001; 97:3790–7.
45. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2006; 41: 354-60.
46. Ma L, Elliott SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 6470-6475.
47. Maloney JP, Silliman CC; Ambruso DR; Wang J; Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol.* 1998; 275: H1054–H1061.

48. Mattila K J, Valle M S, Nieminen M S, Valtonen V V, Hietaniemi K L. Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1993; 103: 205-11.
49. Mcgee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol*. 1998; 69: 865-71.
50. Miyazono K, Heldin C. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature*. 1989; 338: 557-62.
51. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1b, interleukin 6, b2-microglobulin, and transforming growth factor-a in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol*. 1999; 44: 535-39.
52. Naito M, Sakai E, Shi Y, Ideguchi H, Shoji M, Ohara N, et al. Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. *Mol Microbiol*. 2006; 59: 152-67.
53. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxillofacial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 798p.
54. Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1979; 50: 450-61.
55. O'reilly MS, Boehm, T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997; 88: 277-85.
56. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 216-48.



57. Papapanagiotou D, Nicu EA, Bizzarro S, Gerdes VE, Meijers JC, Nieuwland R. Periodontitis is associated with platelet activation. *Atherosclerosis*. 2009; 202: 605-611. Epub 2008 May 28.
58. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282: C947-70.
59. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994; 330: 1287-94.
60. Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, et al. Platelet-active drugs: the relationships among doses, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2001; 119 Suppl: 39S-63S.
61. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809–20.
62. Pitchford SC. Novel uses for anti-platelet agents as anti-inflammatory drugs. *Br J of Pharmacol*. 2007; 152: 987–1002 [Epub 2007 Jul 2].
63. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*. 1999; 100: 1667-72.
64. Resende CR. Granuloma periférico de células gigantes: imunohistoquímica anti-tnf- $\alpha$  [tese de mestrado]. Duque de Caxias: Unigranrio; 2007.
65. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA, et al. A p38 [mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol*. 2007; 78: 1992-8.
66. Romanowski AW, Squier CA, Lesch CA. Permeability of rodent junctional epithelium to exogenous proteins. *J Periodontal Res*. 1998; 23: 81-6.
67. Rovin S, Costich EE, Gordon AH. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germ-free and conventional rats. *J Periodontal Res*. 1996; 1: 193-203.

68. Sallay, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J. Periodontal Res.* 1982; 17: 263-74.
69. Sasaki Y, Ishii I, Giddings JC.; Yamamoto, J. Protective effects of ticlopidine and aspirin, administered alone and in combination, on thrombus formation in rat cerebral vessels. *Haemostasis.* 1996; 26: 150-6.
70. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Poll TVD. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008, 83:536-45.
71. Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. *Intern Dent J.* 2001; 51: 417-27.
72. Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes and coronary artery disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 130-43.
73. Sugidachi, A, Asai F; Ogama F, Inoue T, Koike H. The in vivo pharmacological profile of CS- 747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1439- 46.
74. Taka T, Okano E, Seiki J, Yamamoto J. Effects of clopidogrel on platelet activation and coagulation of non-anticoagulated rat blood under high shear stress. *Haemostasis.* 1999; 29: 189-96.
75. Takata T, Nikai H, Ijuhin N, Ito H. Penetration and uptake of colloidal gold-labeled Concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. *J Periodontol.* 1988; 59: 823-982.
76. Taylor DW, Barnett HJM, Haynes RB, Ferguson GG, Sackett DL, Thorpe KE. Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: a randomized controlled trial *Lancet* 1999; 353: 2179-84.

77. Ueda N, Nishihara T, Ishihara Y, Amano K, Kuroyanagi T, Noguch T. Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polisaccharide antigen of *Actinibacillus actinimycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiol Immunol*. 1995; 10: 69-75.
78. Von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, et al. Rantes deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001; 103: 1718–20.
79. Wallace JL. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med*. 1999; 107:, 11S-17S.
80. Wallace JL, McKnight W, Soldato PD, Baydoun AR, Cirino G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide releasing, gastric sparing aspirin derivative. *J. Clin. Invest*. 1995; 96: 2711-18.
81. Wakai K, Kawamura T, Umemura O, Machida J, Anno T, et al. Associations of medical status and physical fitness with periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1999; 26: 664–72.
82. Wang C, Tani-Ishii, Stashenko P. Bone-resortive cytokine gene expression in periapical lesion in the rat. *Oral Microbiol Immunol*. 1997; 2: 65-71.
83. Wang H, Leigh J. Intervention of Ticlopidine on Silica-induced Inflammatory Reaction and Apoptosis (online). *Environmental Health*. 2005. 5: 23-32.[citado em 2010 Mar 20].
84. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003; 2: 1–9.
85. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*. 2004; 25: 489–95.

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 24 de março de 2010

MARIANA NOGUEIRA DE FIGUEIREDO