



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RENATA MENDONÇA MORAES

**EFEITOS DA EXENATIDA E DA SITAGLIPTINA DURANTE A
INDUÇÃO DA PERIODONTITE EM RATOS**

2014

RENATA MENDONÇA MORAES

**EFEITOS DA EXENATIDA E DA SITAGLIPTINA DURANTE A INDUÇÃO
DA PERIODONTITE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ. Estadual Paulista, Câmpus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Moraes, Renata Mendonça

Efeitos da Exenatida e da Sitagliptina durante a indução da
periodontite em ratos / Renata Mendonça Moraes. - São José dos
Campos : [s.n.], 2014.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientadora: Ana Lia Anbinder.

1. Incretinas. 2. Periodontite. 3. Diabetes mellitus . I.
Anbinder, Ana Lia, orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III.
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP
- Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 09 de Dezembro de 2014
E-mail: renatammoraes13@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP - Univ Estadual Paulista

Câmpus de São José dos Campos

Profa. Dra Marinella Holzhausen Caldeira

Faculdade de Odontologia

Universidade de São Paulo - USP

Câmpus de São Paulo

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP - Univ Estadual Paulista

Câmpus de São José dos Campos

São José dos Campos, 09 de Dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

À minha família que sempre me apoiou e incentivou.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor dos estudos, da dedicação, responsabilidade e compromisso com tudo que nos propomos a realizar.

À minha irmã Paula, que sempre foi uma inspiração para mim.

À minha família do coração: Aline, Natália, Vanessa e Fernanda, pessoas especiais que Deus me concedeu o privilégio de conviver, e que sempre fizeram minha vida muito mais feliz e completa.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de estar aqui e ter vivenciado situações enriquecedoras e que contribuíram para minha evolução pessoal, profissional e espiritual.

À Unesp- Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, pela oportunidade e suporte na realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP (processo nº: 2013/17747-1), pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha mais que orientadora, a Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, por ter sido um exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino, por ter estado sempre à disposição quando precisei, e principalmente por ter acreditado e confiado em mim sempre, desde minha iniciação científica e durante todo o mestrado.

Aos professores que, mesmo que indiretamente, colaboraram muito com meu experimento. À Profa Dra Mônica Fernandes Gomes, por ter contribuído com material e por ter colocado o CEBAPE (Centro de Biociências Aplicada a Pacientes com Necessidades Especiais) à nossa disposição, sempre que necessitamos. À Profa. Dra. Maria Eli Leonelli de Moraes, que auxiliou na padronização da técnica radiográfica utilizada neste trabalho. Ao Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, pela semana de treinamento em Biologia Molecular, que embora devido ao tempo não faça parte desta dissertação, faz parte do experimento como um todo, e pela gentileza e solicitude que sempre teve comigo. Ao Prof. Dr.

Ivan Balducci, que sempre manteve as portas da sua sala abertas, e que auxiliou na realização da estatística deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal por estarem sempre dispostos a me ajudar, principalmente ao Sr. Antônio D. S. B. M. Vasconcellos (Seu Toninho), que ajudou no trato dos animais e por servir o melhor cafezinho desta Faculdade e ao Walter Cruz, que auxiliou na descalcificação das peças e no preparo das lâminas deste trabalho.

As minhas colegas de equipe, Bruna Jordão Motta Corazza, Vanessa Cristina de Oliveira Mazza e Débora Reis Cleto Campos, que auxiliaram nas fases de biotério. Ao Rodrigo da Costa Pereira, que além de auxiliar no biotério, auxiliou na tomada das radiografias. Às amigas de pós-graduação Maria Fernanda Lima Villaça Carvalho, Milagros Del Valle El Abras Ankha, Renata Pilli Jóias e Miriane Carneiro Machado Salgado que também auxiliaram na fase de biotério.

Agradeço em especial à querida amiga Ana Carolina Valim de Brito, que foi todos os dias controlar a alimentação dos animais e administrar os medicamentos comigo, além de auxiliar na análise radiográfica; sou muito grata pela sua amizade e companheirismo, com certeza essa fase muito mais leve devido à sua presença.

Ao Felipe Eduardo de Oliveria e a Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, que auxiliaram na realização dos testes ELISA. Obrigada Felipe, pela disponibilidade e comprometimento que teve comigo, assim como pelas conversas e comilanças.

À querida amiga Gabriela de Moraes Gouvêa Lima, que me acolheu desde o início do mestrado e me ensinou muitas das técnicas que foram utilizadas neste trabalho. Gostaria de agradecer principalmente pela amizade e conversas reconfortantes, que tornaram essa jornada mais fácil.

Ao amigo Guilherme Rodrigues Teodoro, meu salvador de todas as horas, sempre disponível para ajudar, fosse emprestando materiais, fosse ajudando em cálculos matemáticos ou simplesmente tomando um café.

À Patrícia Pimentel de Barros, que auxiliou na extração de RNA e na confecção de cDNA. Pessoa exemplo de solidariedade, competência e comprometimento, muito obrigada pela ajuda.

À Gabriela de Fátima Santana Melo, pelas horas de estudo e por dividir comigo seu conhecimento, pelo auxílio na fase de biotério e coloração das lâminas deste trabalho. Obrigada também pelas conversas e conselhos, sem você esta caminhada teria sido muito mais pesada.

Aos amigos da pós, Juliana Bueno Santana, Elis Andrade de Lima Zutin, Laís Morandini Rodrigues, Victor Bernardes Barroso da Costa, Vivian Narana Ribeiro El Achkar, Adriana Rocha de Caris, Luciana Rocha Strieder, Noala Vicensoto Moreira Milhan, Lara Tolentino Ferreira, Rodnei Dennis Rossoni, Celina Faig Lima Carta, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Yonara Maria Freire Soares Marques, Ana Paula Lima e Rosana Ferreira Silva pela oportunidade de ter convivido com pessoas tão especiais, pelas intermináveis horas estudando lâminas, pelos almoços e "rega-bofes", que certamente deixarão saudades.

Às tantas outras pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Incretinomiméticos e inibidores da DPP-4	17
2.2 Incretinas e osso	20
2.3 Inibidores da DPP-4 e osso	25
2.4 Incretinas e inibidores da DPP-4 na inflamação	26
3 PROPOSIÇÃO	30
3.1 Geral	30
3.2 Específica	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Grupos experimentais	31
4.3 Indução da doença periodontal	34
4.4 Glicemia	35
4.5 Peso	36
4.6 Eutanásia	36
4.7 Dosagem sérica de GIP, GLP-1 e DPP-4 por ensaio imunoenzimático ELISA	37
4.8 Análise Radiográfica	38
4.9 Avaliação histomorfométrica	39
4.10 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Peso dos animais	43
5.2 Glicemia	44

5.3 Ensaio imunoenzimático	44
5.3.1 GIP	44
5.3.2 GLP-1	45
5.3.3 DPP-4	46
5.4 Análise radiográfica.....	47
5.5 Análise histomorfométrica da região de furca.....	48
5.6 Análise histomorfométrica linear da região distal	49
5.6.1 Perda óssea linear na região distal	49
5.6.2 Perda de inserção histológica	50
5.7 Porcentagem de colágeno na região distal.....	51
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	68
8 REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO	81

Moraes RM. Efeitos da exenatida e da sitagliptina durante a indução de periodontite em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

A diabetes mellitus e a periodontite são patologias inflamatórias prevalentes e que se agravam mutuamente. Os novos medicamentos para o tratamento da diabetes, os agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e os inibidores da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), têm apresentado efeitos pleiotrópicos como estimulação da formação e inibição da reabsorção óssea e características anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso da exenatida (agonista do GLP-1) e da sitagliptina (inibidor da DPP-4) na periodontite induzida em ratos. Foram utilizados 40 ratos divididos em quatro grupos: 1) exenatida (GE):animais com periodontite induzida e que receberam 3 µg/Kg/dia de exenatida por via subcutânea; 2) sitagliptina (GS) animais com periodontite induzida e que receberam 10 mg/Kg/dia de sitagliptina por via oral; 3) com doença periodontal (DP) e 4) controle (GC), ambos receberam os veículos de dissolução dos medicamentos. A periodontite foi induzida pela inserção de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e os medicamentos foram administrados por 28 dias. No dia do sacrifício, os animais foram pesados e foi coletado sangue para análise sorológica de polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), GLP-1, DPP-4 e glicose. As hemimandíbulas foram submetidas à análise radiográfica para avaliação do suporte ósseo alveolar, e a processamento histológico para análise histomorfométrica (área de perda óssea alveolar na região de furca, perda óssea linear interproximal e porcentagem de colágeno). O uso dos medicamentos levou a menor porcentagem de ganho de peso e mas não influenciou a glicemia dos animais. A sitagliptina reduziu a concentração de DPP-4, enquanto a exenatida não aumentou os valores de GLP-1. Nas análises radiográfica e histomorfométrica, comprovou-se a eficácia da indução da periodontite, com diferença significativa de suporte ósseo, perda óssea alveolar e porcentagem de colágeno entre os grupos DP e GC, por outro lado não houve diferença estatística entre os grupos DP e testes. Conclui-se que, dentro dos parâmetros deste estudo, tanto a exenatida quanto a sitagliptina não foram efetivas na estabilização e recuperação da periodontite em ratos.

Palavras-chave: Incretinas. Periodontite. Diabetes mellitus.

Moraes RM. *Effects of exenatide and sitagliptin during periodontitis induction in rats [dissertation]*. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a high prevalent disease as well as periodontitis. The literature supports a two way relationship between them. A new class of drugs for diabetes treatment, peptide-like glucagon-1 (GLP-1) agonists and dypeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors, has shown pleiotropic effects, like bone anabolic, antiresoptive and antiinflammatory actions. The aim of this study was to evaluate the effect of exenatide (GLP-1 agonist) and sitagliptin (DPP-4 inhibitor) during periodontitis induction in rats. Forty male rats were divided into four groups: 1) exenatide group (GE): animals with induced periodontitis that received 3 µg/Kg/day of exenatide subcutaneously; 2) sitagliptin group (GS): animals with induced periodontitis that received 10 mg/Kg/day with sitagliptin orally; 3) periodontal disease group (PD) and 4) control group (CG); both treated with the drug vehicles. Periodontitis was induced by the insertion of ligature around the first molars and the drugs were administered for 28 days. On the day of sacrifice, animals were weighed and blood were collected for serum analysis of GIP, GLP-1 and DPP-4. The mandibles underwent radiographic analysis for assessment of alveolar bone support, and the histological processing for histomorphometric analysis (area of bone loss in the furcation area, linear interproximal bone loss and percentage of collagen). The use of the drugs led to a lower percentage of weight gain and had no influence on glucose levels. Sitagliptin reduced the concentration of DPP-4, while exenatide had no influence on GLP-1 levels. In radiographic and histomorphometric analysis, it was proved the effectiveness of induction of periodontitis, with a significant difference of bone support, alveolar bone loss and percentage of collagen between the PD and CG. On the other hand there was no statistical difference between the test groups and PD group. In conclusion, within the parameters of this study, both exenatide and sitagliptin were not effective in the stabilization and recovery of periodontitis in rats.

Keywords: *Incretins. Periodontitis. Diabetes mellitus.*

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa resultante da inflamação dos tecidos de suporte do dente, que leva à perda progressiva do ligamento e osso com formação de bolsa e /ou recessão da gengiva (American Academy of Periodontology, 2001). Em 2010, a periodontite grave foi considerada a sexta doença mais prevalente no mundo, afetando 743 milhões de pessoas. Estes dados apontam para o enorme problema de saúde pública que é a doença periodontal (Kassebaum, 2014). Nos Estados Unidos, aproximadamente 47% dos adultos com idade igual ou superior a 30 anos (cerca de 65 milhões de adultos) têm periodontite: 8,7% com periodontite leve, 30% moderada e 8,5% grave. A prevalência da periodontite aumenta com a idade: 5,9%, 53% e 11,2% dos adultos com idade superior a 65 anos têm periodontite leve, moderada e grave, respectivamente (Eke *et al.*, 2012). Como a população mundial está envelhecendo e tem maior probabilidade de manter os dentes por mais tempo do que as gerações passadas, espera-se que a prevalência de periodontite aumente e consequentemente os gastos com o tratamento e prevenção desta doença (Centers for Disease Control and Prevention-CDC, 2003).

Essa doença é desencadeada principalmente pelo acúmulo de biofilme bacteriano. Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede das bactérias Gram-negativas e outras endotoxinas estão envolvidas no processo de reabsorção óssea, estimulando a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL) e diminuindo a de osteoprotegerina (OPG). Além disso, as bactérias também liberam a endotoxina dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) que leva a degradação do colágeno e estimulam a liberação e ativação de enzimas

proteolíticas como as lipases e as metaloproteinases de matriz (MMP) pelo hospedeiro agravando a degradação do colágeno e auxiliando na invasão tecidual (Abiko *et al.*, 1984). As bactérias ainda estimulam a resposta inflamatória do hospedeiro, com a liberação de mediadores químicos, como as prostaglandinas (PG), interleucinas (IL)-1 e 6, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (INF- γ), óxido nítrico, elastases e collagenases. Essas substâncias também desregulam a via RANKL/OPG, sendo que este conjunto leva ao agravamento da perda óssea (Aemaimanan *et al.*, 2009; Graves *et al.*, 2011; Gurav, 2012). A periodontite é iniciada pelo acúmulo do biofilme, mas existem outras condições que influenciam a sua progressão, conhecidas como fatores de risco. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença periodontal, encontram-se: estilo de vida, fumo, obesidade e síndrome metabólica, osteoporose, estresse, fatores genéticos e diabetes mellitus (Genco, Borgnakke, 2013).

A diabetes mellitus é uma desordem patológica caracterizada pela hiperglicemia, causada tanto por deficiência na produção da insulina quanto na sua ação. Existem 3 tipos de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2, e gestacional. Na diabetes mellitus tipo 1, o pâncreas é incapaz de produzir insulina. Na diabetes mellitus tipo 2, o pâncreas produz pouca insulina ou a insulina produzida não pode ser processada. No diabetes gestacional, a paciente apresenta menor efetividade da insulina durante a gravidez. Em indivíduos normoglicêmicos, os valores de glicemia apresentam-se entre 60 e 110 mg/dL, sendo que valores abaixo e acima representam estados de hipo e hiperglicemia, respectivamente. A diabetes mellitus é diagnosticada quando os valores de glicemia em jejum superam 126 mg/dL, e valores entre 110 e 126 mg/dL representam um quadro de pré-diabetes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011). Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), em 2013, a população mundial com diabetes foi estimada em 382 milhões, sendo que há uma previsão de aumento de 55% em 2035, quando se

estima que existirão cerca de 592 milhões de pessoas com diabetes. A IDF aponta uma prevalência de 24 milhões de pessoas vivendo com diabetes mellitus nas Américas Central e Sul, e o Brasil é o quarto país com o maior número de pessoas com diabetes em idades entre 20-79 anos, num total de 11,9 milhões de pessoas. O órgão também estima que, no ano de 2013, foram gastos, nas Américas Central e do Sul, 26 bilhões de dólares com o tratamento da diabetes mellitus.

O quadro de hiperglicemia característico da diabetes leva a formação irreversível de produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) e a um aumento na expressão de seus receptores (RAGEs) (Brett *et al.*, 1993). Os AGEs podem se ligar aos seus receptores em diferentes tipos celulares como macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais. A interação dos AGEs com os RAGEs promove a maior liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF α , além de enzimas como as MMPs, responsáveis pela reabsorção óssea na periodontite. Além disso, ao se ligarem ao seu receptor nas células, os AGEs alteram o metabolismo celular, causando liberação de radicais livres de oxigênio, induzindo o chamado estado de estresse oxidativo celular. A interação de AGEs com os RAGEs das células endoteliais pode resultar, em parte, na perpetuação do processo inflamatório periodontal, devido ao aumento da expressão da molécula de adesão vascular endotelial-1 (VCAM-1), que aumenta a migração e saída de células inflamatórias para o periodonto (Lalla *et al.*, 1998). Finalmente a hiperglicemia modula negativamente a relação RANKL/OPG (Kerbauy *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2013).

Tanto a doença periodontal como a diabetes são doenças crônicas, que apresentam uma relação bidirecional. O aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, tanto em pacientes com diabetes como em pacientes com doença periodontal, agrava mutuamente o quadro de ambas as condições (Genco, Borgnakke, 2013). Na doença periodontal há liberação de citocinas e produção de radicais livres de oxigênio, que podem alcançar a corrente sanguínea e levar a um quadro de inflamação

sistêmica, ativando algumas quinases que suprimem a sinalização de insulina (resistência insulínica), estágio que precede a diabetes (Gurav, 2012).

No indivíduo normoglicêmico, após a ingestão de alimento há a liberação de três hormônios no intestino: peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP-2) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). O GIP e o GLP-1 estão envolvidos na secreção de insulina e glucagon e consequentemente no controle da glicemia circulantes, sendo conhecidos como incretinas (do inglês *incretin*= *IN*testinal *se*CRETion of *IN*sulin). O GLP-2 está relacionado à regulação da absorção de nutrientes e estimulação do crescimento da mucosa intestinal (Wallis *et al.*, 2007). Uma vez liberados GLP-1, GLP-2 e GIP são rapidamente inativados pela DPP-4, uma enzima amplamente distribuída no corpo, tanto na forma de receptor de membrana quanto na forma solúvel na circulação. Portanto, esses peptídeos apresentam uma curta meia-vida (Wallis *et al.*, 2007; Kruger *et al.*, 2010). A diminuição da ação dos hormônios GLP-1 e GIP contribui para uma secreção inadequada de insulina, supressão inadequada do glucagon e produção descontrolada de glicose hepática (DeFronzo, 2009).

Os novos medicamentos para diabetes têm como objetivo aumentar a ação das incretinas, devido ao seu importante papel no controle da glicemia. Essa classe de medicamentos inclui os agonistas do receptor do GLP-1 (GLP-1R) e os inibidores da DPP-4. Dentre os agonistas GLP-1R aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) nos Estados Unidos está a exenatida (Byetta®) e entre os inibidores da DPP-4 está a sitagliptina (Januvia®). Os efeitos desses medicamentos incluem aumento da secreção de insulina dependente de glicose, inibição da secreção de glucagon pós-prandial, redução da produção hepática de glicose e aumento da disposição de glicose (Baggio, Drucker, 2007).

Estudos recentes têm evidenciado alguns efeitos pleiotrópicos das incretinas, entre eles: ação anti-apoptótica, ação protetora do sistema cardiovascular, nervoso e renal, efeitos gastrointestinais, no reparo de feridas e no tecido ósseo (Mcintosh *et al.*, 2010; Gupta, 2012). No tecido ósseo, as incretinas estimulam a formação e inibem a reabsorção óssea em animais diabéticos e osteopênicos (Wong *et al.*, 2010).

Neste estudo nós levantamos a hipótese que a exenatida e a sitagliptina, princípios ativos das novas classes de medicamentos utilizados no tratamento da diabetes, poderiam auxiliar na modulação da doença periodontal. Essa proposição se baseia nos efeitos pleiotrópicos dessas substâncias observadas tanto no metabolismo ósseo quanto na inflamação. Não existe nenhum estudo na literatura abordando os efeitos das incretinas e dos inibidores da DDP-4 na periodontite. Tanto a diabetes quanto a doença periodontal, são doenças muito prevalentes, e se for constatado que estes medicamentos utilizados para o tratamento da diabetes podem influenciar a perda óssea observada na periodontite, o paciente poderia se beneficiar com o uso de apenas um medicamento para ambas as doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Incretinomiméticos e inibidores da DPP-4

Após uma refeição, três hormônios são liberados pelo intestino: GIP, GLP-1 e GLP-2. O GLP-1 e o GLP-2 são secretados pelas células neuroendócrinas L, principalmente no íleo e cólon, enquanto o GIP é secretado pelas células neuroendócrinas K no duodeno e jejuno. Várias formas de GLP-1 são secretados *in vivo*, incluindo suas formas inativas (GLP-1 (1-37) e GLP-1 (1-36) NH₂) e biologicamente ativas ou intactas (GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36) NH₂). O GLP-1 ativo secretado estimula a liberação de insulina pelas células β pancreáticas, suprime a secreção de glucagon pelas células α , reduz a produção hepática de glicose, retarda o esvaziamento gástrico e promove a sensação de saciedade. O GLP-2 está associado ao controle da absorção de nutrientes no intestino. O GIP age principalmente na secreção de insulina dependente de glicose pelo pâncreas, mas não age na secreção de glucagon, na sensação de saciedade e esvaziamento gástrico. A enzima DPP-4 rapidamente inativa o GIP e GLP-1, controlando os seus efeitos. O aumento da secreção de insulina e redução de glucagon estimulados por esses hormônios frente à ingestão oral de glicose denomina-se “efeito incretina”(Figura 1) (Baggio, Drucker, 2007).

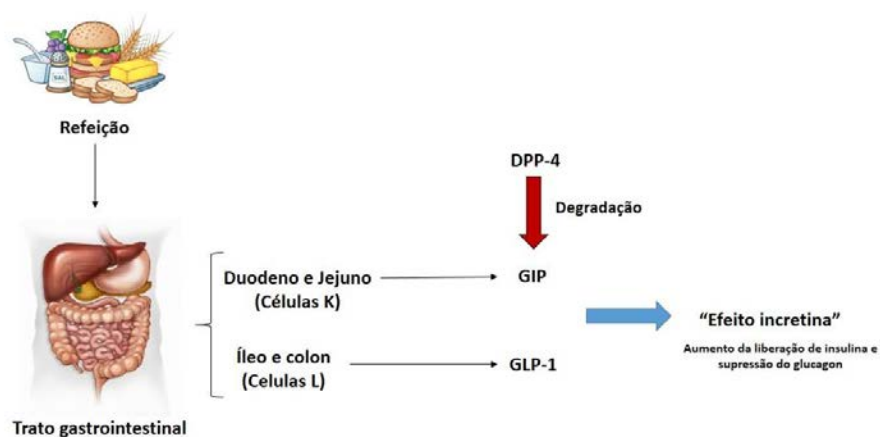


Figura 1 - O GLP-1 e o GIP são liberados pelo intestino após a ingestão de alimentos e induzem a secreção de insulina (efeito incretina- "*incretin action*"). A DPP-4 rapidamente inativa o GLP-1 e o GIP diminuindo a secreção de insulina. Figura adaptada do artigo *Biology of incretins: GLP-1 and GIP* (Baggio, Drucker, 2007). As imagens que compõem o esquema foram copiadas da internet*.

Devido à conhecida ação das incretinas na regulação da insulina e consequente controle da glicemia, os novos medicamentos para diabetes têm como alvo o aumento da ação desses hormônios. Nos indivíduos diabéticos, observa-se uma expressão comprometida dos receptores e uma diminuição da sensibilidade das células β do pâncreas ao GIP, sendo que a administração de GIP exógeno não aumenta a liberação de insulina, o que não torna o GIP um alvo para o tratamento da diabetes. Por outro lado, nos diabéticos ocorre uma diminuição na liberação de GLP-1, sem comprometimento dos seus receptores. Logo, quando GLP-1 é administrado de forma exógena, há aumento dos níveis de insulina, tornando esta via mais atrativa para o desenvolvimento de fármacos (Neumiller, 2009). Portanto, os novos medicamentos desenvolvidos para o tratamento da diabetes aumentam a meia-vida das incretinas pela inibição da DPP-4 ou estimulam os receptores de GLP-1.

*Fonte: <http://semcabelocom.blogspot.com.br/2010/10/ma-alimentacao-causa-calvicie.html> (Refeição) e <http://nutricaoodofuturo.files.wordpress.com/2013/01/sistema-digestivo.jpg> (Trato gastrointestinal).

Dentre os agonistas do GLP-1 ou incretinomiméticos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) nos Estados Unidos está a exenatida (Byetta®), versão sintética do exendin-4 encontrado na saliva do lagarto *Gila monster*. A exenatida apresenta 50% de semelhança com o GLP-1 humano, meia-vida de 2-4 horas, é eliminada pelos rins e deve ser administrada por via subcutânea duas vezes ao dia, 1 hora antes das principais refeições (Davidson *et al.*, 2005). A liraglutida (Victoza®) corresponde ao GLP-1 humano sintético com alterações em alguns aminoácidos para aumentar a sua meia-vida (13 horas), e deve ser administrada por via subcutânea, uma vez ao dia em qualquer horário. Ainda, foi desenvolvida uma fórmula da exenatida que apresenta meia-vida de uma semana (Bydureon®), diminuindo a quantidade de injeções necessárias (Tomkin, 2014).

O *International Diabetes Center* (IDC) e a *European Association for the Study of Diabetes* (ADA) aprovam o uso de exenatida como monoterapia ou terapia complementar aos tratamentos convencionais como um adjunto na redução da glicemia associado à dieta e exercícios. O *American College of Endocrinology* (ACE) propõe a exenatida como monoterapia de primeira escolha (Nathan *et al.*, 2009). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes preconiza o uso dos incretinomiméticos como terapia combinada ao uso da metformina no caso de manifestações leves a moderadas da diabetes (glicemia de 200-400 mg/dL) (Sociedade Brasileira de Diabetes- SBD, 2011). A exenatida estimula a perda de peso e é mais eficaz em diminuir a glicemia pós-prandial quando comparada aos tratamentos convencionais como a metformina (Amori *et al.*, 2007). No entanto, o medicamento apresenta alguns efeitos colaterais, como náuseas e vômitos, pancreatite aguda e alguns estudos em roedores relatam a possibilidade de tumor das células C da tireoide, porém este efeito parece se desenvolver apenas em roedores. A terapia com administração semanal da exenatida leva à redução nos efeitos colaterais gastrointestinais (Drucker *et al.*, 2008).

Uma abordagem alternativa ao uso dos incretinomiméticos é prolongar a ação do GIP e GLP-1 endógeno através da inibição da DPP-4. Os inibidores da DPP-4 reduzem a atividade da DPP-4 sérica em 80%, tendo a vantagem de serem administrados oralmente. Dentre os inibidores da DPP-4 aprovados pela FDA estão a vildagliptina (Galvus®), a sitagliptina (Januvia®), a saxagliptina (Onglyza®) e a linagliptina (Trayenta®). Os efeitos dos inibidores da DPP-4 incluem aumento da secreção de insulina dependente de glicose, inibição da secreção de glucagon pós-prandial, redução da produção hepática e aumento da disposição de glicose (Baggio, Drucker, 2007). Como já citado, a Sociedade Brasileira de Diabetes indica o uso desses medicamentos como monoterapia ou em associação com metformina, sendo que já existe no mercado um medicamento que combina a sitagliptina com a metformina (JANUMET®). Esses medicamentos também apresentam efeitos colaterais como náusea, dor abdominal e diarreia, embora a sua tolerabilidade pelo paciente seja maior quando comparada aos incretinomiméticos (Wang *et al.*, 2014).

2.2 Incretinas e osso

Estudos *in vitro* têm demonstrado a ação do GIP, GLP-1 e GLP-2 em algumas células ósseas. Receptores para o GIP (GIPR) estão presentes nos osteoblastos e osteoclastos (Bollag *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2007; Pacheco-Pantoja *et al.*, 2011) e receptores para GLP-1, em osteoblastos (Nuche-Berenguer *et al.*, 2011; Pacheco-Pantoja *et al.*, 2011) e osteócitos (Kim *et al.*, 2013). Os osteoblastos também possuem receptores para GLP-2 (Nuche-Berenguer *et al.*, 2011; Pacheco-Pantoja *et al.*, 2011). O GIP inibe a apoptose osteoblástica (Bollag *et al.*, 2000; Tsukiyama *et al.*, 2006) e aumenta os níveis de fosfatase alcalina (ALP) e

colágeno tipo 1, marcadores de formação óssea (Bollag *et al.*, 2000) em células de osteossarcoma humano (MG63 e SaOS2). Em osteócitos em condições de hiperglicemia, o GLP-1 diminui a secreção de esclerostina, proteína que inibe a formação óssea (Kim *et al.*, 2013).

Alguns estudos *in vivo* também foram realizados, evidenciando os efeitos benéficos das incretinas no osso. Após análise imuno-histoquímica ou de hibridização *in situ* em ossos de ratos, alguns autores observaram a presença de GIPR em osteoblastos (Bollag *et al.*, 2000) e osteoclastos (Bollag *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2007). Em outro estudo (Bollag *et al.*, 2001) também foi observado que ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com GIP (0,05 mg/Kg/dia, via intravenosa, durante 6 semanas) apresentaram atenuação dos efeitos negativos da OVX na densidade óssea vertebral.

Tsukiyama *et al.* (2006) investigaram o efeito do GIP sobre osteoblastos e na distribuição e armazenamento do cálcio da dieta no osso. Os camundongos *knockout* para o gene do GIPR (GIPR^{-/-}) apresentavam trabéculas ósseas mais delgadas, maior número de osteoclastos e menos osteoblastos, mostrando a importância do GIP na supressão da reabsorção e indução da formação óssea. A concentração de cálcio plasmático foi maior nos camundongos GIPR^{-/-}, indicando um papel do GIP na conexão entre o cálcio ingerido e a sua deposição no osso.

Yamada *et al.* (2008) estudaram o papel do GLP-1 endógeno no metabolismo ósseo. Camundongos *knockout* para o gene do receptor GLP-1 (GLP-1R^{-/-}) apresentaram osteopenia cortical, maior número de osteoclastos e atividade reabsortiva na tíbia, e menores níveis de calcitonina. A administração de exenatida-4 em ratos do grupo controle (*wild type*) aumentou os níveis circulantes de calcitonina, evidenciando que o GLP-1 age no metabolismo ósseo provavelmente através de uma via dependente da calcitonina.

Ding *et al.* (2008) observaram que camundongos transgênicos com superexpressão do gene que codifica o hormônio GIP apresentavam maior densidade óssea no fêmur quando comparados com o grupo controle (*wild type*) a partir dos seis meses de idade, diferença que se acentuava com o envelhecimento animal. Os autores observaram ainda a diminuição da expressão de GIPR nas células progenitoras da medula óssea com o envelhecimento, concluindo que os animais transgênicos estariam protegidos da perda óssea induzida pela idade.

Nuche-Berenguer *et al.* (2009) avaliaram a ação do GLP-1 em ratos com diabetes tipo 2 e insulino-resistentes e observaram aumento na expressão dos genes de *osteocalcina* (OC), OPG e RANKL na tíbia dos animais tratados com GLP-1 (0,86 nmol/Kg/hora por 3 dias, após implantação de minibomba osmótica), sendo que OPG e OC foram mais expressas nos animais com diabetes tipo 2 e insulino-resistentes comparados aos controles. Continuando seus estudos com ratos diabéticos e resistentes à insulina, Nuche-Berenguer *et al.*, em 2010 verificaram que o tratamento com exenatida (0,1 nmol/kg/h durante 3 dias) aumentou a expressão de OC em todos os grupos e OPG nos ratos controle e resistentes a insulina, além de reduzir RANKL nos animais controle e com diabetes. Em 2011, Nuche-Berenguer *et al.*, estudaram a ação do GLP-1 e da exenatida (0,1 nmol/kg/h durante 3 dias) em ratos submetidos à dieta hiperlipídica e observaram o aumento da expressão dos genes de OC, OPG e RANKL na tíbia dos animais tratados, aumento da densidade óssea vertebral e no fêmur, além de inibição da reabsorção óssea observada na histomorfometria.

Kim *et al.* (2013) observaram a presença de receptores de GLP-1 em osteócitos de fêmur de ratos através de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Os autores também observaram que o tratamento com exenatida diminuiu a expressão de *SOST* (gene que codifica a esclerostina) nos osteócitos de ratos. Foi constatado também que após 3 semanas do tratamento com injeções

subcutâneas de 5 nmol/Kg de exenatida-4 em ratos obesos com diabetes tipo 2, a densidade óssea no fêmur aumentou quando comparada ao grupo controle, assim como a concentração sérica de OC e redução dos níveis séricos de esclerostina. Esses achados demonstram que a exenatida aumenta a densidade mineral óssea (DMO) femoral de ratos diabéticos possivelmente através da redução da expressão de *SOST*/esclerostina nos osteócitos desses animais.

Ma *et al.* (2013) investigaram os efeitos da administração de exenatida (1, 3 e 10 µg/Kg/dia durante 4 e 16 semanas) na remodelação óssea em ratas idosas OVX. O tratamento por 4 semanas com 3 µg promoveu aumento da expressão gênica de *ALP*, colágeno tipo 1 (*col1*), *OC* e *OPG*, além de diminuir a expressão de *RANKL*. Em 16 semanas, o tratamento nas doses de 3 e 10 µg diminuiu o peso corporal, reduzindo-os até o nível de peso das ratas submetidos à falsa-OVX (cirurgia *sham*), aumentou a atividade da *ALP*, níveis de *OC* e propeptídeo do colágeno tipo 1 (*PINP*) e diminuiu a expressão de *RANKL*. O tratamento com 10 µg aumentou a densidade óssea do fêmur e vertebral, melhora na microestrutura trabecular e na resistência óssea, aumento no número de osteoblastos e redução no número de osteoclastos nas ratas OVX em 16 semanas.

Gaudin-Audrain *et al.* (2013) avaliaram o volume, microarquitetura e qualidade óssea de camundongos *knockout* para o GIPR, e observaram aumento da fração do volume ósseo trabecular (BV/TV), aumento na espessura (Tb.Th) e do número de trabéculas ósseas (Tb.N), além de diminuição na separação trabecular (Tb.Sp). Também foi observada diminuição no número de osteoclastos e aumento da atividade osteoblástica. No entanto, propriedades mecânicas intrínsecas da tíbia foram reduzidas. Os autores concluíram que a ausência GIPR leva ao aumento do volume trabecular com redução da qualidade óssea.

Mieczkowska *et al.* (2015) observaram o efeito da deleção dos receptores das incretinas GIP e GLP-1 em camundongos e observaram que esses animais apresentavam aumento da massa óssea e número de trabéculas, no entanto, o diâmetro, a espessura e a área da cortical óssea apresentavam-se reduzidas, assim como também houve redução na maturidade do colágeno no fêmur. Os autores concluíram que devido às grandes modificações observadas na microestrutura e qualidade óssea nos animais *knockout*, comprova-se a importância desses hormônios na regulação da qualidade óssea.

Abaixo, resumindo o que foi exposto no texto, encontra-se um esquema da influência das incretinas no tecido ósseo (Figura 2).

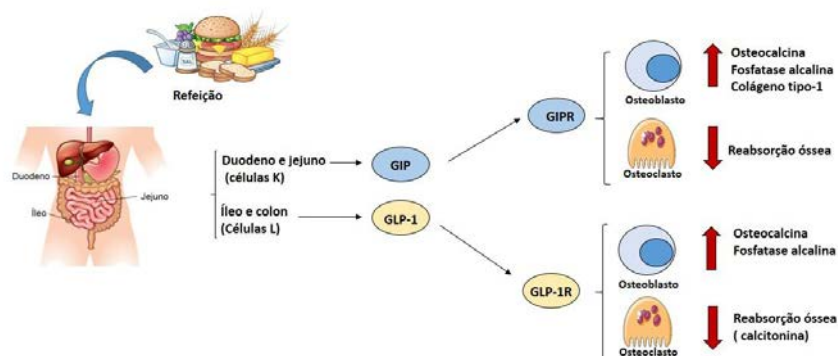


Figura 2 - A ingestão de alimentos induz a secreção de GIP e GLP-1 pelas células K e L, respectivamente. O GIP liberado se liga ao seu receptor (GIPR) nos osteoblastos e leva ao aumento da produção de OC, ALP e colágeno tipo-1. Nos osteoclastos, ele diminui a reabsorção óssea, através de mecanismo ainda desconhecido. O GLP-1, quando se liga ao seu receptor GLP-1R nos osteoblastos, aumenta a produção de OC e ALP. Por sua vez, a sua ação nos osteoclastos parece ser indireta, através da estimulação da produção de calcitonina pela tireoide. Figura adaptada do artigo *Incretins and bone: evolving concepts in nutrient-dependent regulation of bone turnover* (Yavropoulou, Yovos, 2013). Imagens que compõem o esquema foram copiadas da internet*.

* Fonte: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/osteoinmunologia-el-estudio-relacion-entre/articulo/90218872> (osteoclasto); <http://semcabelocom.blogspot.com.br/2010/10/ma-alimentacao-causa-calvicie.html> (Refeição) e <http://www.infoescola.com/anatomia-humana/intestino-delgado/> (Trato gastrointestinal).

2.3 Inibidores da DPP-4 e osso

Kyle *et al.* (2011) investigaram o efeito da redução da atividade da DPP-4 na qualidade óssea em camundongos. Para avaliação da influência da inibição química da DPP-4, os autores administraram sitagliptina (4 g/Kg na ração) durante 7 dias a camundongos machos, fêmeas e fêmeas OVX, alimentados com dieta com alto teor de gordura. Os machos apresentaram DMO areal vertebral aumentada, por sua vez as fêmeas tiveram aumento mais expressivo da DMO volumétrica e microarquitetura vertebral. No entanto, tais melhorias não foram encontradas nas fêmeas após ovariectomia. Todos os camundongos tiveram aumento da mineralização. Os autores também estudaram a influência da depleção gênica da DPP-4, e observaram diferença apenas na DMO vertebral e femoral das fêmeas OVX, sendo que a mecânica femoral permaneceu intacta nas fêmeas e machos DPP-4^{-/-}. Concluiu-se que a inibição da DPP-4 leva a poucas e sutis alterações na qualidade óssea.

Cusick *et al.* (2013) investigaram o efeito da administração da sitagliptina em diferentes doses (100, 300 e 500 mg/Kg/dia) por 12 semanas na densidade óssea em fêmur e vértebra de ratas com deficiência de estrogênio através de absorciometria de feixe duplo de raios-X (DEXA). Observaram que a sitagliptina foi efetiva no aumento da DMO apenas na concentração de 500 mg/Kg/dia nas vértebras lombares, sugerindo um efeito neutro ou benéfico dos inibidores da DPP-4 no osso.

Glorie *et al.* (2014) estudaram a influência do tratamento com sitagliptina (2 g/L na água de beber) em ossos de ratos diabéticos, e observaram que, em 12 semanas, o tratamento com o inibidor da DPP-4 diminuiu a perda óssea trabecular, com a conservação do número e espaço entre trabéculas, sendo que com uso do medicamento, os ratos

diabéticos apresentaram fenótipo ósseo semelhante aos ratos não diabéticos. O tratamento com sitagliptina resultou em um contínuo crescimento do osso cortical, tendência que também foi observada nos animais controles tratados com sitagliptina. No entanto, nos demais parâmetros, o fenótipo ósseo dos animais controle permaneceu inalterado pelo tratamento com sitagliptina.

Alguns estudos em humanos mostraram que o tratamento com inibidores da DPP-4 pode ser associado a diminuição do risco de fraturas. Monami *et al.* (2011) realizaram uma meta análise que incluiu 28 ensaios clínicos, e observaram que o número de fraturas nos grupos que recebiam inibidores da DPP-4 era menor que nos grupos placebos. No entanto, os estudos disponíveis apresentavam tempo de tratamento relativamente curto (cerca de 52 semanas), e a avaliação de fraturas não era o objetivo final, sendo relatados apenas como efeitos adversos. Além disso, não foi possível separar os pacientes por sexo, assim como as mulheres pós-menopáusicas e pré-menopáusicas. Apesar dessas limitações, os estudos disponíveis sugerem que os inibidores da DPP-4 podem ter um efeito protetor no osso.

2.4 Incretinas e inibidores da DPP-4 na inflamação

Alguns estudos também foram desenvolvidos observando a ação anti-inflamatória dos agonistas do GLP-1R e dos inibidores da DPP-4 (Hatwal, 2012).

Chung *et al.* (2009) estudaram a influência da exenatida em cultura de adipócitos e observaram que o tratamento com exenatida na concentração de 2,5 e 5 nM durante 8 horas aumentou a expressão de adiponectinas e IL-10 e diminuiu IL-6 e proteína quimiotática de

monócitos-1 (MCP-1), demonstrando a ação anti-inflamatória do medicamento nos adipócitos.

Pugazhenthii *et al.* (2010) avaliaram a influência da exenatida em cultura de células pancreáticas humanas, de doadores sem história prévia de diabetes. O tratamento com exenatida diminuiu a expressão de TNF- α , demonstrando a ação anti-inflamatória do mesmo.

Shah *et al.* (2011) administraram alogliptina (inibidor da DPP-4- 40 mg/Kg/dia) durante 12 semanas a camundongos com deficiência no receptor da lipoproteína de baixa densidade, que apresentavam aterosclerose e resistência à insulina e observaram a redução da inflamação através da inibição da ativação e quimiotaxia de monócitos, o que demonstrou um efeito desses medicamentos na aterosclerose e diminuição da inflamação.

Schürmann *et al.* (2012) estudaram a influência da linagliptina (inibidor da DPP-4- 3 mg/Kg/dia) na cicatrização de feridas em camundongos normais e camundongos hiperfágicos, diabéticos e obesos (*ob/ob*). O medicamento foi administrado 2 dias antes da realização da ferida nas costas e 10 dias após. Os autores observaram que a DPP-4 é expressa constitutivamente nos queratinócitos da pele não injuriada, e que após a injúria a expressão de DPP-4 é reduzida e assim permanece durante as fases mais ativas de reparo (até 5 dias) nos animais normais. Por outro lado, nos animais *ob/ob*, a expressão de DPP-4 foi aumentada nos estágios finais de reparo, retardando o processo. A administração de linagliptina diminuiu essa expressão de DPP-4 nos animais *ob/ob*, assim como diminuiu a expressão de COX-2 e proteína inflamatória do macrófago-2 e aumentou a diferenciação miofibroblástica, melhorando a cicatrização e epitelização nesses animais.

Makdissi *et al.* (2012) avaliaram a influência da administração de sitagliptina (100 mg/dia) em dose única e em 12 semanas, na produção de citocinas e outras substâncias em cultura de células mononucleadas isoladas do sangue dos pacientes. Os autores

observaram que tanto a dose única quanto o tratamento de 12 semanas com sitagliptina diminuíram a expressão de TNF- α , toll-like receptors (TRL)-4, TRL-2, quinase c-Jun N-terminal (JNK-1), quinase inibitória K β (IKK β), receptor de citocina-2 (CCR-2) e CD26 (forma de DPP-4 expressa em membrana) nas células isoladas e diminuíram a concentração sérica de proteína C reativa e IL-6. Os autores concluíram que a sitagliptina tem ação anti-inflamatória e que a diminuição da expressão de CD26 pode demonstrar uma ação na inibição da DPP-4 além da supressão da sua ação enzimática.

Rizzo *et al.* (2012) avaliaram a influência do tratamento com sitagliptina (100 mg/dia durante 12 semanas) em pacientes com diabetes tipo-2 não controlada com o uso de metformina. Os autores observaram que o aumento da amplitude de excursões glicêmicas leva a um aumento do estresse oxidativo e que a administração de sitagliptina diminuiu a concentração sérica de IL-6, IL-8 e proteína C-reativas, concluindo que a sitagliptina alivia os efeitos oxidativos das excursões glicêmicas.

Shiraki *et al.* (2012) estudaram a influência da liraglutida (30 nM) em células endoteliais da veia umbilical de humanos *in vitro* e observaram efeito anti-inflamatório e anti-oxidativo, diminuindo a liberação de citocinas, quinases e espécies reativas de oxigênio.

Cechin *et al.* (2012) estudaram a influência da exenatida (10 nM) em cultura de células pancreáticas humanas, e observaram que o tratamento com o medicamento diminuiu os níveis de IL-1 β , IL-2, IL-17 e INF- γ após 48 horas e induziu a liberação da proteína inibitória sérica-9 (PI-9), molécula muito importante na resposta imune, uma vez que é o único inibidor intracelular da granzima B liberada pelos linfócitos T citotóxicos, demonstrando uma ação anti-inflamatória e citoprotetora deste medicamento.

Chaudhuri *et al.* (2012) estudaram a influência da exenatida (10 μ g/2 vezes ao dia durante 12 semanas) em pacientes

obesos com diabetes tipo 2. Os autores também avaliaram a influência da dose única de 5 µg do medicamento nesses mesmos pacientes. Observou-se que o tratamento com dose única ou de 12 semanas com exenatida diminui a expressão de espécies reativas de oxigênio, fator nuclear K β , IL-1 β e TNF- α e diminuiu os níveis circulantes de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e IL-6. Os autores concluíram que a exenatida é um potente anti-inflamatório.

Lee *et al.* (2012) estudaram em camundongos *knockout* (camundongos *ob/ob*), a ação anti-inflamatória do GLP-1 no tecido adiposo e nos macrófagos deste tecido. Os autores demonstraram que a administração de um adenovírus recombinante produtor de GLP-1 (4×10^9 unidades formadoras de placas) previamente à inoculação de LPS, foi efetiva em diminuir a liberação de IL-6 e TNF- α , induzida por LPS após 6 horas, *in vitro* e *in vivo*, concluindo que o GLP-1 têm ação anti-inflamatória no tecido adiposo.

Frente a influência da exenatida e da sitagliptina no tecido ósseo e na inflamação, levantamos a hipótese de que o uso de tais fármacos poderiam modular a progressão da periodontite induzida em ratos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os efeitos da exenatida (agonista do GLP-1) e da sitagliptina (inibidor da DPP-4), durante a patogênese da doença periodontal.

3.2 Específica

Determinar os efeitos da exenatida e sitagliptina em ratos com DP induzida, por meio da avaliação de:

- a) Influência dos medicamentos na glicemia;
- b) Porcentagem de ganho de peso;
- c) Suporte ósseo alveolar radiográfico;
- d) Perda óssea alveolar microscópica na região distal e da furca do 1º molar inferior;
- e) Quantidade de fibras colágenas sobre a crista óssea distal;
- f) Concentração sérica de DPP-4, GIP e GLP-1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos (machos) (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente noventa dias de idade, que foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos. A manipulação dos animais seguiu as recomendações da lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da nossa Unidade (04/2013-PA/CEP) (ANEXO A).

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente, em quatro grupos de acordo com o medicamento recebido:

-Grupo Exenatida (GE): dez animais nos quais foi induzida doença periodontal por meio de ligadura com fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores e receberam 3 µg/Kg/dia (Ma *et al.*, 2013) do agonista do GLP-1 (Byetta®, Eli Lilly, São Paulo, SP, Brasil), por via subcutânea (Figura 3a e 3b).

-Grupo Sitagliptina (GS): dez animais nos quais foi induzida doença periodontal e receberam 10 mg/Kg/dia (Marques *et al.*, 2014) do inibidor da DPP-4 (Januvia®, MSD, Campinas, SP, Brasil) por gavagem (Figura 3c e 3d).

-Grupo Doença Periodontal (DP): dez animais nos quais foi induzida doença periodontal e receberam apenas o veículo de dissolução dos medicamentos testados;

-Grupo Controle (GC): dez animais nos quais não foi induzida doença periodontal, e receberam o veículo de dissolução dos medicamento testados.

A exenatida foi diluída com água para injetável de forma que a dose de 3 µg/Kg/dia fosse administrada num volume de 100 µl na região subcutânea abdominal do animal. A sitagliptina foi diluída em água destilada de forma que a dose de 10 mg/Kg/dia fosse administrada também num volume de 100 µl por gavagem. Dada a diferença de via de administração dos medicamentos testados, os animais do GS receberam também injeções do veículo de dissolução da exenatida (água para injetável) e os animais do GE receberam o veículo de dissolução da sitagliptina (água destilada) por gavagem.

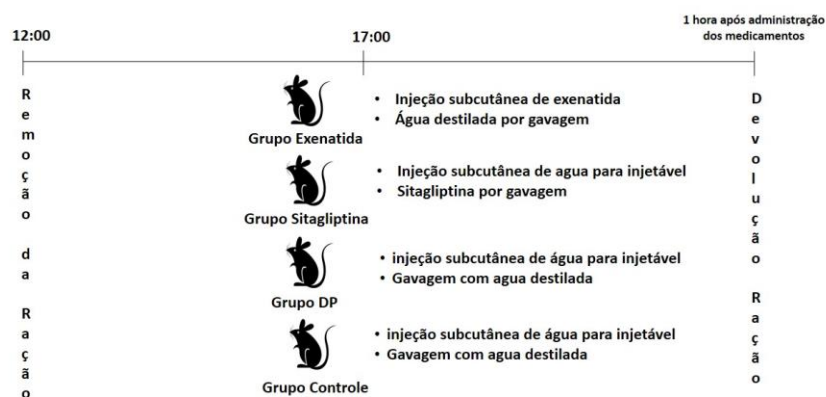
O Byetta® deve ser administrado com pelo menos uma hora de jejum e o paciente deve permanecer em jejum por mais uma hora após a administração do medicamento*. Com isso em vista, a ração era removida da gaiola de todos os animais ao meio dia, para garantir no mínimo 1 hora de jejum dos animais e os medicamentos e placebos administrados às 17 horas. A ração era devolvida à gaiola somente 1 hora após a administração dos medicamentos e placebos (Figura 4). Durante os períodos de jejum, os animais podiam beber água *ad libidum*. O horário de administração do medicamento foi escolhido devido aos hábitos noturnos dos animais.

*BYETTA. Preda MA. Bloomington – EUA: Baxter pharmaceutical solutions llc; 2013. Bula de remédio [Acesso em 15 Jan 2015]. Disponível em: https://www.lilly.com.br/Inserts/Patients/Bula_Byetta_CDS03AGO11_Pac.pdf



Figura 3 - a) Embalagem da exenatida comercial (Byetta®); b) Animal recebendo a injeção subcutânea da exenatida na concentração de 3 µg/Kg/dia; c) Embalagem da sitagliptina comercial (Januvia®); d) Animal recebendo sitagliptina na dose de 10 mg/Kg/dia por gavagem.

Figura 4 - Esquema demonstrando a metodologia de administração dos medicamentos.



Os animais eram privados de alimentação, ao meio dia para garantir pelo menos 1 hora de jejum no horário de aplicação dos medicamentos. Às 17 horas, eram administrados os medicamentos e os controles de acordo com cada grupo. A ração era devolvida às gaiolas 1 hora após o término da administração do medicamento a todos os animais, garantindo uma hora de jejum.

4.3 Indução da doença periodontal

Todos os animais, previamente pesados, foram anestesiados com uma mistura de 13 mg/kg de cloridrato de xilazina 2 % (Anasedan- VetBrands International, Miramar, Flórida, EUA) com 33 mg/kg de cetamina base (Dopalen- Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) por via intramuscular para indução da doença periodontal, que foi realizada por meio de inserção de duas voltas de fio de algodão 3-0 ao redor dos primeiros molares inferiores dos animais. Os ratos anestesiados foram imobilizados em mesa apropriada, na qual permaneciam com a boca aberta. A amarria das pontas do fio permaneceu na superfície mesial do dente (Figura 5). A ligadura foi mantida durante todo o período experimental, que teve a duração de 28 dias. Nos animais do grupo GC não foi induzida doença periodontal, entretanto eles foram anestesiados e manipulados da mesma maneira que os demais. A administração do medicamento, de acordo com o grupo, foi iniciada no dia seguinte à inserção da ligadura. Transcorridos 14 dias, os animais foram novamente anestesiados, pesados e checados quanto à presença da ligadura, sendo que os animais em que a mesma não estava presente foram descartados do estudo.

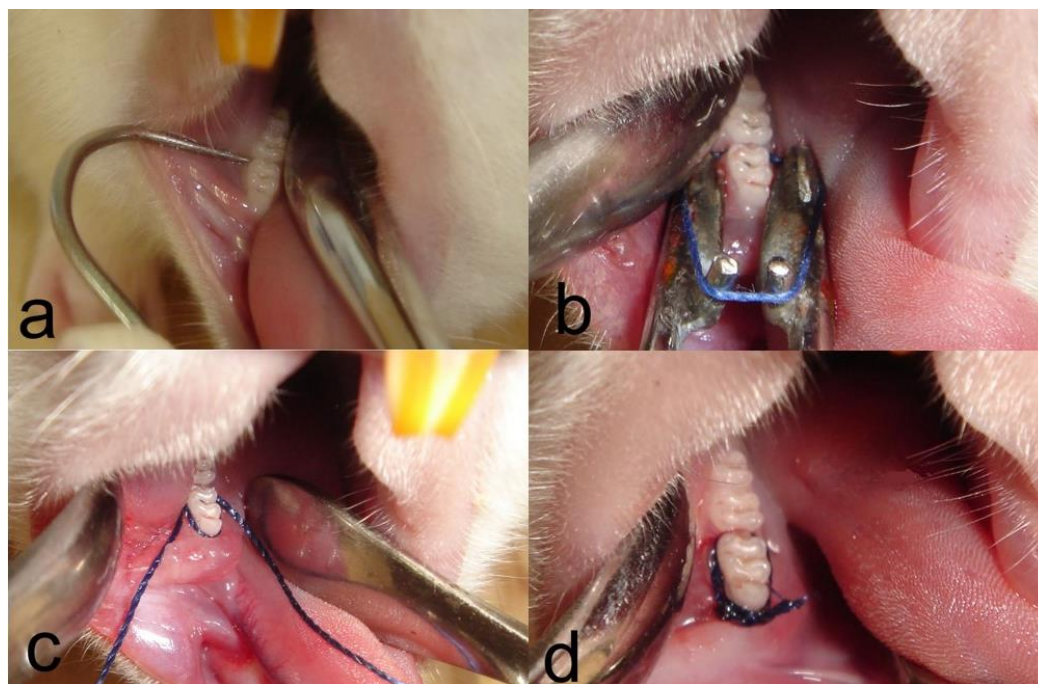


Figura 5 - Etapas da inserção da ligadura para indução da doença periodontal: a) Afastamento do ponto de contato com o auxílio de um explorador nº 5; b) Inserção do fio de algodão 3-0 utilizando pinça adaptada; c) Visualização do fio ao redor do primeiro molar inferior, pronto para a amarra; d) Ligadura inserida ao redor do primeiro molar inferior.

4.4 Glicemia

No dia anterior à eutanásia, a ração foi retirada às 20 horas, para que os animais estivessem em jejum de 12 horas no momento do sacrifício. No dia da eutanásia, após os animais serem anestesiados, foi realizada a mensuração da glicemia basal através de punção de sangue na artéria caudal, com o auxílio do aparelho One Touch Ultra mini® (Johnson&Johnson Medical Group, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6) para posterior averiguação de influência dos medicamentos testados nos níveis de glicemia.



Figura 6 - Medição da glicemia basal dos ratos no dia do sacrifício com o aparelho One Touch Ultra mini® (Johnson&Johnson Medical Group, São Paulo, SP, Brasil).

4.5 Peso

Os animais foram pesados em 3 momentos: 1) no dia da inserção da ligadura; 2) no meio do experimento (dia 14) dia em que foram anestesiados para verificação da presença de ligadura e 3) no dia da eutanásia (dia 29). Os valores dos pesos foram tabulados e convertidos para porcentagem de ganho de peso.

4.6 Eutanásia

Transcorridos 28 dias de tratamento, os animais foram novamente anestesiados por via intramuscular com a mistura de cetamina e xilazina, como anteriormente descrito. Após pesagem e medição da glicemia basal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão longitudinal da região púbica até o processo xifoide, abrindo a caixa torácica com a exposição do coração, onde foi

introduzida uma agulha acoplada a um tubo com gel separador de soro (Tubo gel BD SST® II Advance BD, São Paulo, SP, Brasil) no ventrículo esquerdo, para coleta de cerca de 4 ml de sangue. Em seguida, o animal foi decapitado em guilhotina e as hemimandíbulas esquerdas e direitas removidas e condicionadas em paraformaldeído tamponado 4% durante 48 horas, após o quê foram transferidas para álcool 70% e armazenadas a 4 °C.

O sangue coletado permaneceu em temperatura ambiente para coagulação durante 2 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, durante 15 minutos, quando então o soro foi coletado e mantido a -20 °C até a realização do teste ELISA.

4.7 Dosagem sérica de GIP, GLP-1 e DPP-4 por ensaio imunoenzimático ELISA

Os testes foram realizados, em duplicata, conforme instruções do fabricante de cada kit: GIP (US Biological, Salem, MA, EUA), GLP-1 (US Biological, Salem, MA, EUA) e DPP-4 (US Biological, Salem, MA, EUA). Para todos os testes ELISA, utilizaram-se 8 amostras por grupo.

Para avaliação das concentrações totais de GIP e GLP-1, primeiramente as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e todos os reagentes e padrões foram preparados. Cinquenta microlitros de cada amostra ou padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, após o quê 50 µl do “reagente de detecção A” foram adicionados. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado por 3 vezes com tampão de lavagem. Cem microlitros do “reagente de detecção B” foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Novamente, o

conteúdo dos poços foi aspirado e lavado por 5 vezes e 90µl da “solução de substrato” foram adicionados aos poços, para incubação por 20 minutos a 37 °C. Por fim, foram adicionados 50 µl da “solução de parada” e foi realizada a leitura no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450nm. As concentrações de GIP e GLP-1 foram calculadas a partir de uma curva padrão, fornecida com o kit.

Para a detecção dos níveis de DPP-4, cem microlitros de cada amostra ou padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, que foi incubada por 2 horas a 37 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µl do “reagente de detecção A” em cada poço e a placa foi incubada novamente por 1 hora a 37 °C. Os procedimentos seguintes foram os mesmos descritos para a avaliação de GIP e GLP-1.

4.8 Análise Radiográfica

As peças, após limpas, foram radiografadas utilizando o sistema de raio-X digital Gendex, usando o programa VinWix 2000 (Kavo Dental GmbH, Biberach, Baden Württemberg, Alemanha), com tempo de exposição 0,04 segundos, distância objeto-foco de 30 cm e incidência do raio-X por lingual. As peças foram posicionadas no sensor de raio-X com o auxílio de massa para modelar, de maneira as cúspides e raízes vestibulares e linguais deveriam estar sobrepostas na imagem radiográfica (Figura 7a). A análise da porcentagem de suporte ósseo (Klausen *et al.*, 1989) foi calculada a partir das medidas lineares entre ápice da raiz distal e ponta da cúspide distal (segmento AB), entre o ápice da raiz distal e o fundo do defeito/crista óssea (segmento AC), e o ângulo entre esses dois segmentos (ângulo CÂB) (Figura 7b). O ponto C correspondia ao fundo do defeito/crista óssea em região equidistante

entre o primeiro e segundo molar. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa ImageJ 1.3p (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) de acordo com a fórmula abaixo (Anbinder *et al.*, 2006):

$$\text{Suporte ósseo (\%)} = (AC \cos(C\hat{A}B) \times 100) / AB$$

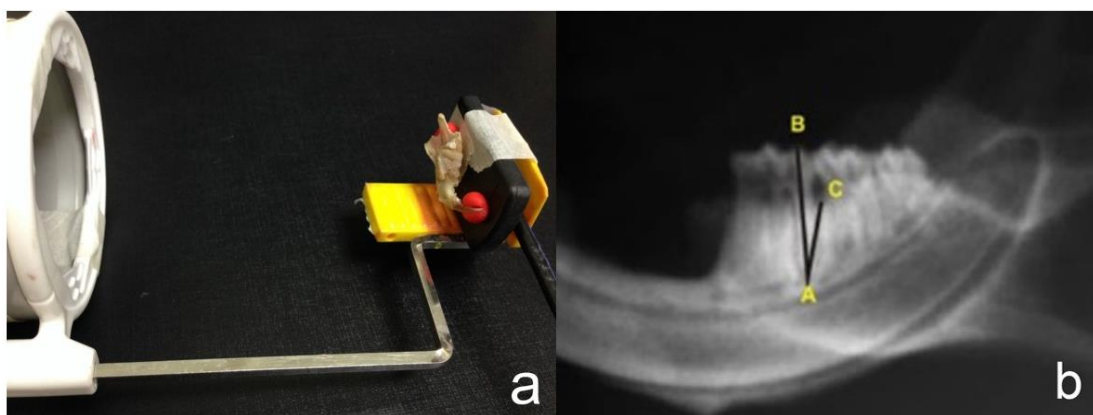


Figura 7 - a) Posicionamento da peça no sensor digital, de tal maneira que o primeiro molar inferior ficasse o mais paralelo possível com o sensor; b) Radiografia com a marcação dos segmentos AB, AC e o ângulo formado entre esses segmentos (CÂB).

4.9 Avaliação histomorfométrica

Para avaliação histológica, as hemimandíbulas esquerdas fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% foram descalcificadas em solução de EDTA (0,5 M, pH 7,8) para posterior inclusão em parafina. Foram, então, confeccionados cortes de 5 µm de espessura na direção méso-distal, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE) e com Picrossirius Red.

A análise histomorfométrica foi realizada usando-se um *software* para análise de imagem (ImageJ 1.31p). Cinco cortes semisseriados por espécime, distantes 20 µm entre si, corados com HE,

foram digitalizados em aumento de 100x. Foram medidas então as distâncias entre a junção cimento-esmalte (JCE) da distal do primeiro molar inferior e a crista óssea alveolar distal (COA) (perda óssea alveolar distal- Figura 8a), e a distância da JCE e a porção mais apical do epitélio juncional (EJ; perda de inserção histológica- Figura 8b). Os cortes corados em HE também foram digitalizados em um aumento de 50x e a área entre o septo interradicular e a superfície cementária na região de furca (perda óssea alveolar em furca- Figura 8c) foi avaliada.

Três cortes semisseriados, corados com picrossírius foram digitalizados, em aumento de 100x na região acima da crista óssea distal. A área de colágeno (de coloração avermelhada) foi selecionada no programa AdobePhotoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA). A porcentagem de área ocupada por colágeno em uma área retangular pré-determinada medindo 0,09 mm de altura e 0,38 mm de largura posicionado junto a raiz distal do 1º molar inferior logo acima da crista óssea foi calculada, após binarização da imagem no programa ImageJ 1.31p (Figura 8d).

Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador calibrado e treinado, no sistema de avaliação cega.

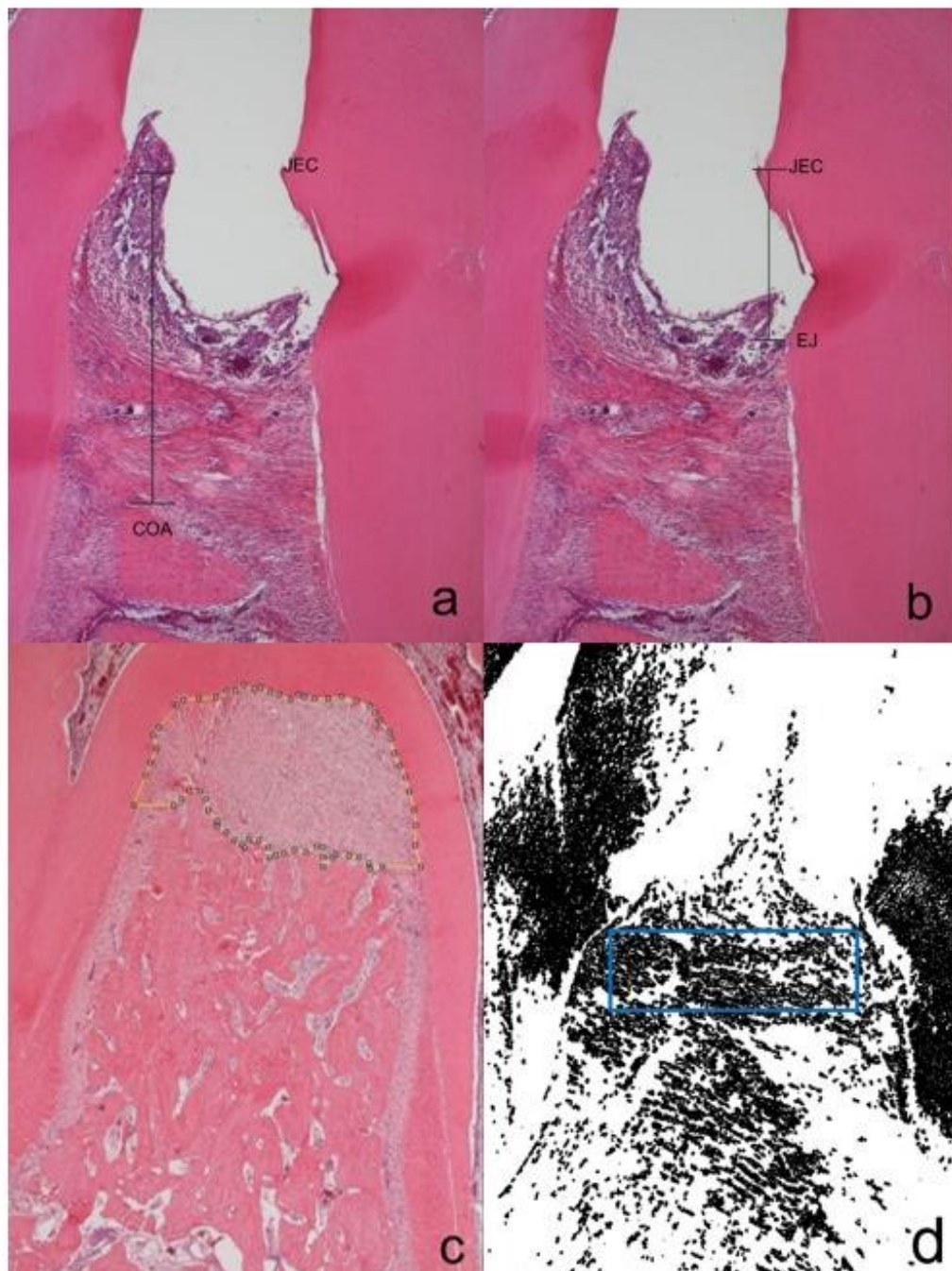


Figura 8 - Análise histomorfométrica. a) Distância entre a junção cimento-esmalte (JEC) e a crista óssea alveolar (COA). Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), num aumento original de 100x; b) Distância entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical do epitélio juncional (EJ). Coloração de HE, em aumento original de 100x; c) Delimitação da área de perda óssea na região de furca. Coloração de HE, em aumento original de 50x; d) Seleção da área de colágeno a ser analisada (retângulo azul) no programa ImageJ. Coloração com Picrossirius red, aumento original de 100x.

4.10 Análise estatística

Em nosso experimento, foram consideradas como variáveis independentes, ou fatores em estudo, a “doença periodontal” (com e sem doença periodontal) e o “medicamento” (controle, sitagliptina e exenatida). Foram consideradas as seguintes variáveis dependentes: “peso”, “glicemia”, “porcentagem de suporte ósseo”, “área de perda óssea na região de furca”, “perda óssea linear interproximal”, “perda de inserção histológica”, “porcentagem de área de colágeno”, “concentração sérica de GIP”, “concentração sérica de GLP-1” e “concentração sérica de DPP-4”.

Os dados obtidos foram analisados segundo a análise de variância (ANOVA) paramétrica e de Kruskal-Wallis com nível de significância de 0,05. Em caso de diferença estatística, utilizaram-se os testes *pos-hoc* de Tukey e Dunn, com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Não houve diferença estatística entre os grupos GC e DP no período de 14 dias e ao fim do experimento, demonstrando que a doença periodontal não influencia o ganho de peso dos animais. Por outro lado, comparando os grupos DP, GS e GE, observou-se que os grupos que receberam medicamento tiveram menor ganho de peso em 14 dias ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis, Figura 9a), e ao fim do experimento ($p < 0,0001$, ANOVA, Figura 9b)

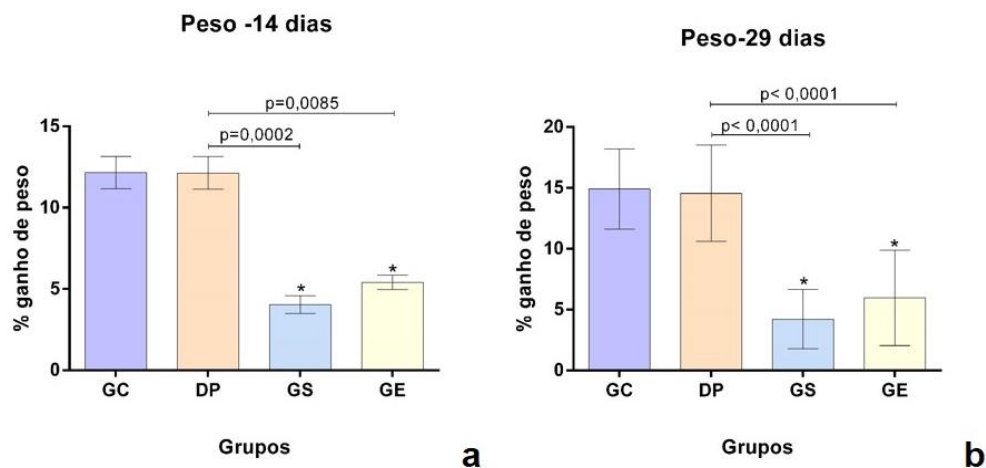


Figura 9 - Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de porcentagem de ganho de peso. a) Valores aos 14 dias de experimento. Após teste Kruskal-Wallis, verificou-se ausência de diferença estatística entre os grupos DP e GC. No entanto, verificou-se diferença estatística entre os grupos DP e GS e DP e GE; b) Valores no período de 29 dias. Após teste ANOVA, constatou-se diferença entre os grupos DP e GS e entre DP e GE. As diferenças estatísticas estão expressas no gráfico. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

5.2 Glicemia

Não se observou diferença estatística ao comparar a glicemia entre todos os grupos ($p= 0,6444$, Kruskal-Wallis) demonstrando que a administração dos medicamentos para o tratamento da diabetes não influenciou a glicemia dos ratos não diabéticos (Figura 10).

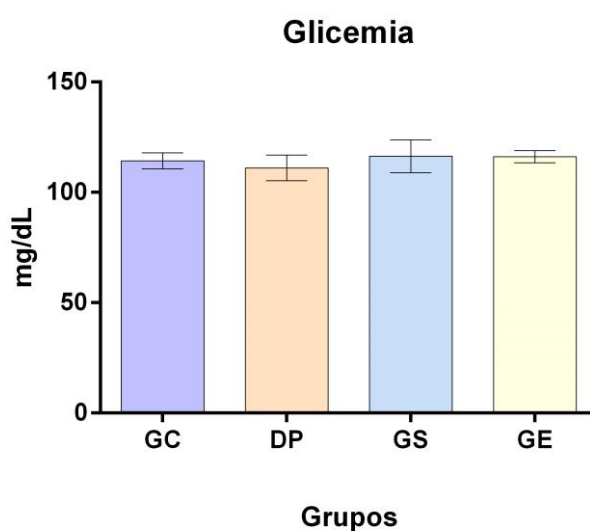


Figura 10 - Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de glicemia ao fim do experimento. Não se observou diferença estatística entre os grupos.

5.3 Ensaio imunoenzimático

5.3.1 GIP

Foi constatada diferença significativa entre os grupos DP e GS e entre DP e GE após o teste de Kruskal-Wallis ($p= 0,0080$) e

Dunn, evidenciando menor concentração do GIP sérico nos animais tratados tanto com sitagliptina quanto com a exenatida (Figura 11).

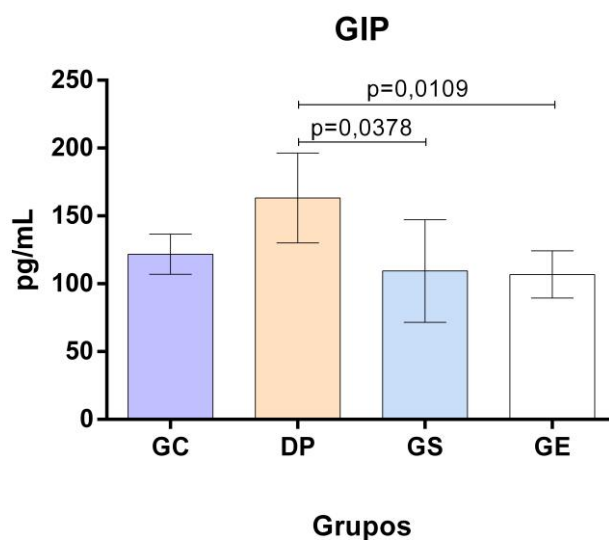


Figura 11 - Gráfico de médias e desvio-padrão da concentração sérica de GIP. As diferenças estatísticas estão expressas no gráfico.

5.3.2 GLP-1

Após realização do teste Kruskal-Wallis e Dunn ($p=0,1105$), observou-se ausência de diferença significativa entre todos os grupos (Figura 12).

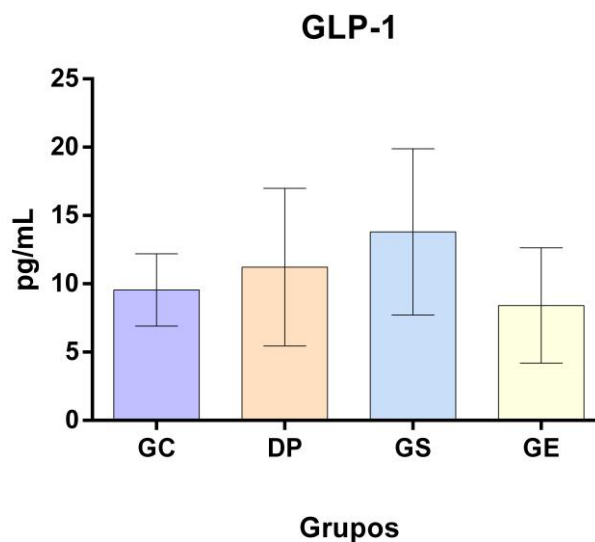


Figura 12 - Gráfico de médias e desvios-padrão da concentração sérica de GLP-1. Não observou-se diferença estatística entre nenhum dos grupos.

5.3.3 DPP-4

Após teste ANOVA observou-se diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os grupos DP e GS e entre GS e GE demonstrando uma redução de 84,8% da concentração de DPP-4 no grupo GS quando comparado ao grupo GC (Figura 13).

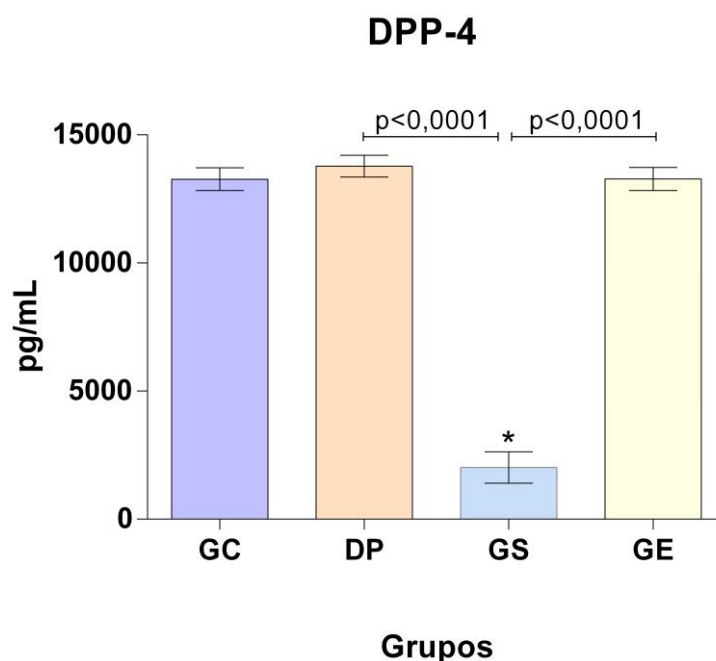


Figura 13 - Gráfico de médias e desvios-padrão da concentração sérica de DPP-4. Nota-se a menor concentração do DPP-4 no grupo em que foi administrada a sitagliptina, demonstrando a efetividade do medicamento. A diferença estatística está expressa no gráfico. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

5.4 Análise radiográfica

Após a análise dos dados observou-se que o método de ligadura foi eficaz na indução da doença periodontal, uma vez que houve diferença estatística entre os grupos GC e DP (ANOVA; $p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferença estatística entre os grupos DP, GE e GS evidenciando a ausência de influência da exenatida e da sitagliptina na inibição da reabsorção óssea induzida pela periodontite (Figura 14a e 14b).

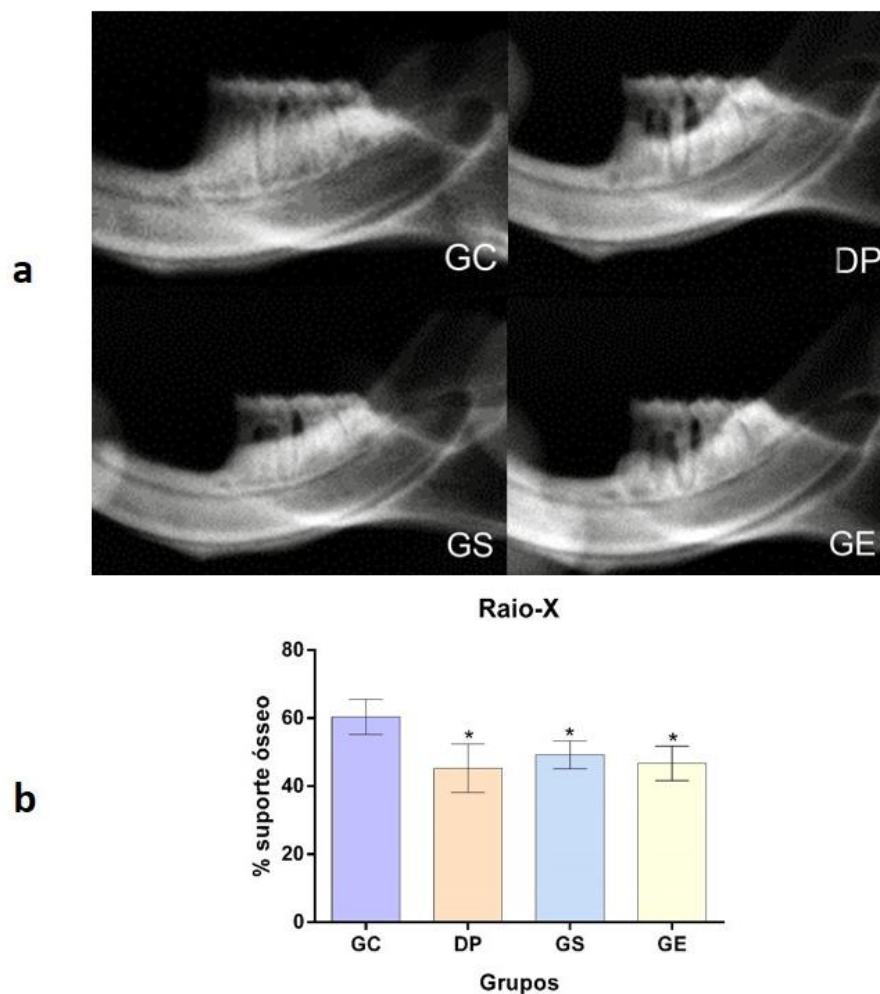


Figura 14 - a) Radiografias de uma animal representativo de cada grupo. Observa-se que há maior suporte ósseo no grupo GC comparado ao DP. Entre os grupos DP, GE e GS a perda óssea é semelhante; b) Gráfico de médias e desvios-padrão de porcentagem de suporte ósseo radiográfico. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

5.5 Análise histomorfométrica da região de furca

Após análise estatística com o teste de Kruskal-Wallis verificou-se diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos DP e GC, evidenciando maior perda óssea no grupo DP, o que indica a indução da doença periodontal. Por outro lado, não houve diferença entre os grupos teste e o DP (Figura 15a e 15b).

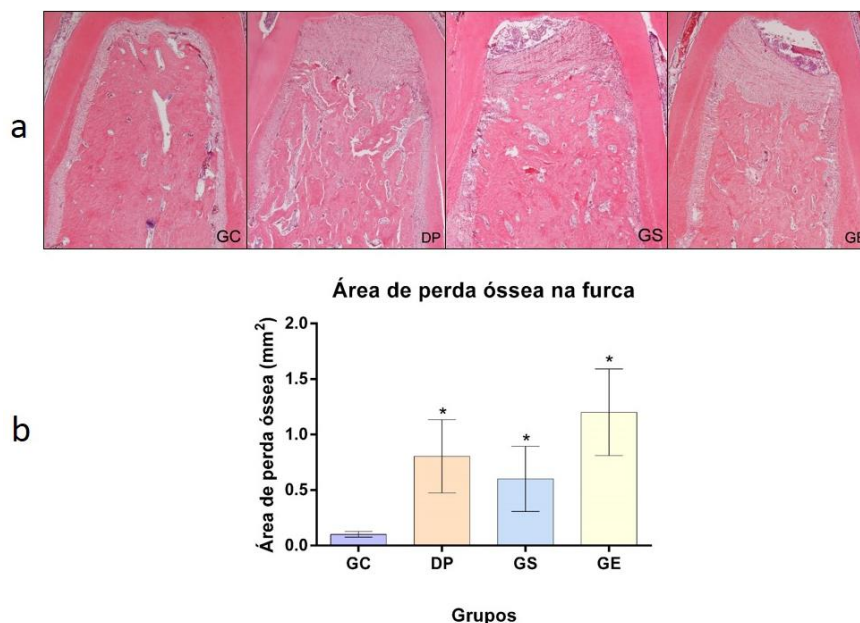


Figura 15 - a) Fotomicrografias da região de furca de um animal representativo de cada grupo. Observa-se que, no grupo Controle, a área de perda óssea é bem menor quando comparada ao grupo DP. Por outro lado, a perda óssea entre os grupos DP, GS e GE é semelhante. Aumento original de 50x, coloração de hematoxilina e eosina; b) Gráfico de médias e desvios-padrão da área de perda óssea alveolar na região de furca. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

5.6 Análise histomorfométrica linear da região distal

5.6.1 Perda óssea linear na região distal

Após Kruskal-Wallis, observou-se diferença significativa ($p = 0,0001$) entre os grupos DP e GC, comprovando novamente a indução da doença periodontal. Por outro lado, não se observou diferença estatística entre os grupos DP, GS e GE (Figura 16a e 16b).

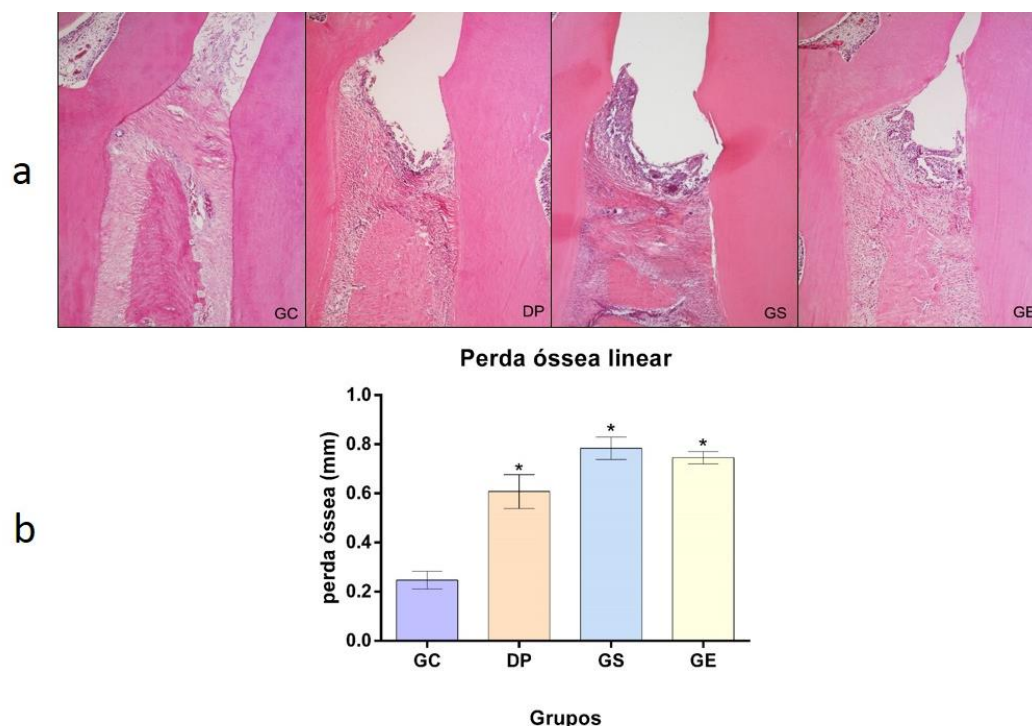


Figura 16 - a) Fotomicrografias da região distal do primeiro molar inferior representativas de cada grupo. Nota-se reabsorção da crista óssea alveolar nos grupos DP, GS e GE, enquanto que no grupo GC a altura da crista óssea mantém-se preservada. Aumento original de 100x, coloração de hematoxilina e eosina; b) Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de perda óssea alveolar distal. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

5.6.2 Perda de inserção histológica

Observou-se diferença entre os grupos DP e o grupo controle, expressa através da estatística da coluna, pois no grupo controle a perda de inserção foi nula. Por outro lado, após análise de Kruskal-Wallis e Dunn, não foi constatada diferença estatística ($p=0,2363$) entre os grupos DP, GS e GE (Figura 17).

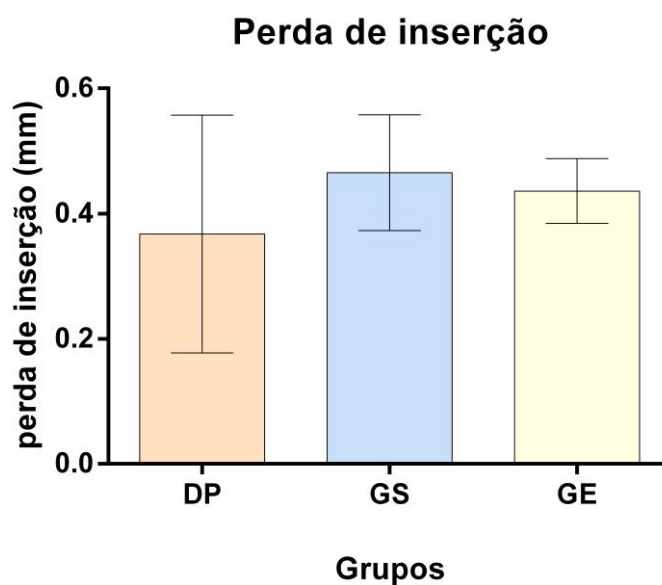


Figura 17 - Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de perda de inserção histológica. Nota-se que entre os grupos a perda de inserção é semelhante.

5.7 Porcentagem de colágeno na região distal

Foi calculada a porcentagem de colágeno da região distal do primeiro molar inferior. Após ANOVA observou-se diferença estatística entre os grupos DP e GC ($p= 0,0002$) sendo que entre os grupos DP, GS e GE não se observou diferença estatística (Figura 18a e 18b).

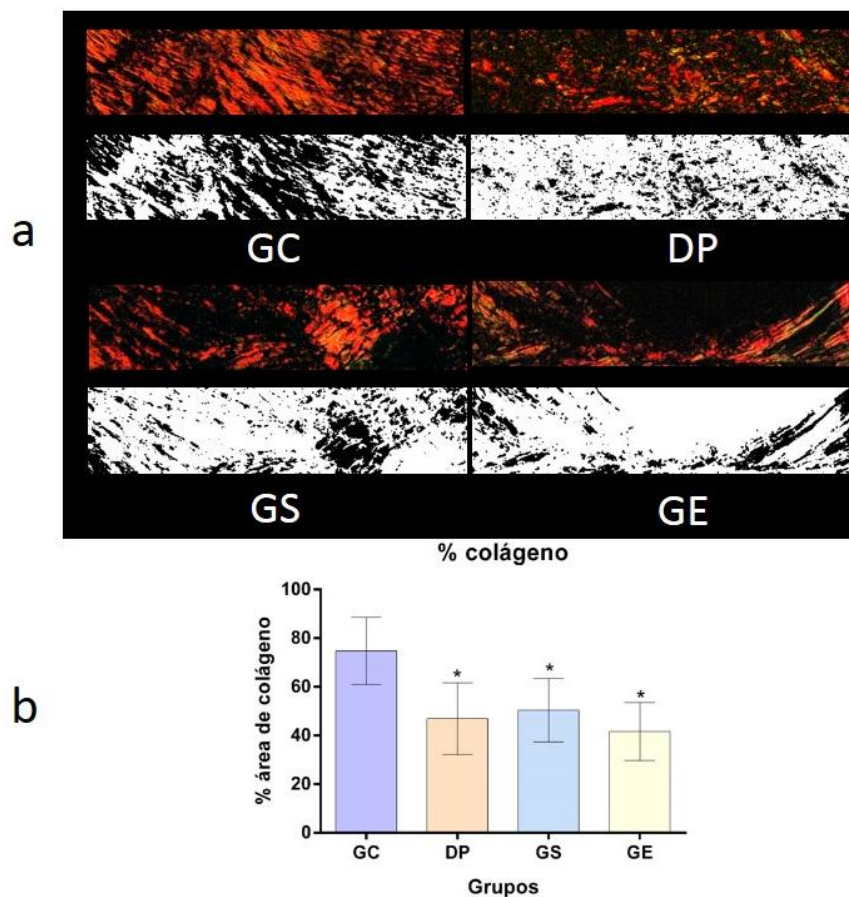


Figura 18 - a) Fotomicrografias dos cortes corados com picrosírius red em microscopia de polarização de um animal representativo de cada grupo, e suas respectivas binarizações no programa Image J. Observa-se uma maior quantidade de colágeno (em vermelho) no grupo controle, sendo que nos demais grupos a proporção de colágeno foi semelhante; b) Gráfico de médias e desvios-padrão dos valores de porcentagem de colágeno na região distal. Observa-se que a porcentagem de colágeno no grupo controle é maior que no grupo DP, com diferença estatística. Por outro lado, não há diferença entre os grupos DP, GS e GE. *Representa diferença estatística com relação ao grupo GC.

6 DISCUSSÃO

Tanto a doença periodontal quanto a diabetes mellitus são doenças altamente prevalentes, que representam um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Animais não diabéticos foram escolhidos para avaliar a influência direta dos medicamentos no periodonto e na doença periodontal. Se os animais fossem diabéticos e houvesse influência dos medicamentos nos tecidos periodontais, não seria possível distinguir se esta melhora foi devida à ação direta do medicamento ou decorrente da melhora do quadro de hiperglicemia, uma vez que já foi constatado que a hiperglicemia observada na diabetes agrava a doença periodontal. Este desenho experimental em que se induz a doença periodontal e inicia-se a administração de medicamentos por via sistêmica para modulação da resposta do hospedeiro é consagrado na literatura e têm mostrado bons resultados com outras classes de medicamentos (Okada *et al.*, 2010; Branco-De-Almeida *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Dalcico *et al.*, 2013).

Neste estudo foi utilizada a exenatida comercial (Byetta®) na dose de 3 µg/Kg/dia (Ma *et al.*, 2013) que aplicando-se a fórmula de conversão de doses entre espécies proposta por Reagan-Shaw *et al.* (2007), equivale a 29 µg/Kg em um adulto com 60 kg, dose acima da preconizada em humanos, que é de 20 µg/dia. Também administramos sitagliptina, um inibidor da DPP-4, na sua forma comercial (Januvia®), e não observamos efeitos desses medicamentos no osso alveolar. No nosso estudo, administramos 10 mg/Kg/dia de sitagliptina (Marques *et al.*, 2014) que equivale a 97,2 mg em um adulto com 60 Kg (Reagan-Shaw *et al.*, 2007). Em humanos a dose preconizada pelo fabricante* é de 100 mg por dia, sendo amplamente utilizada em estudos clínicos (El-Ouaghlidi *et*

*JANUVIA, Lemos FC. Pávia- Itália: Merck Sharp & Dohme S.p.A; 2012. Bula de Remédio.[acesso em: 15 Jan 2015]. Disponível em: http://profissionaisdesaude.msdonline.com.br/binaries/januvia_pac_tcm252-316333.pdf

al., 2007; Tremblay *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Autores que avaliaram a influência desses medicamentos em animais não diabéticos não encontraram efeitos nesses animais ou os efeitos foram observados em períodos entre 12-16 semanas (Ma *et al.*, 2013; Nuche-Berenguer, 2009; Nuche-Berenguer, 2011; Cusick *et al.*, 2013; Glorie *et al.*, 2014). Portanto, o tempo utilizado neste trabalho (4 semanas) pode não ter sido suficiente para o aparecimento dos efeitos desses medicamentos no tecido ósseo. Porém quando presentes, os principais efeitos observados foram na expressão gênica de OC, OPG (Nuche-Berenguer *et al.*, 2009, 2011) e calcitonina (Yamada *et al.*, 2008), assim sendo a avaliação da expressão gênica de algumas citocinas relacionadas à reabsorção, formação óssea e inflamação podem ser ferramentas mais sensíveis para avaliar a ação dos medicamentos durante a periodontite em ratos normoglicêmicos, e propostas para futuros trabalhos.

As vias de administração também variam na literatura, sendo difícil a comparação com os trabalhos que administram a sitagliptina juntamente com a água ou a ração (Kyle *et al.*, 2011; Glorie *et al.*, 2014). Kyle *et al.* (2011) estudaram a ação da sitagliptina no osso, administrando o medicamento a camundongos fêmeas, machos e OVX e observaram aumento na DMO vertebral, BV/TV, Tb.Th e Tb.N e diminuição na Tb.Sp apenas nas fêmeas, embora tenha sido observado um aumento na mineralização tanto em machos quanto em fêmeas, o que pode sugerir uma ação gênero-dependente da sitagliptina. Outra possível explicação para a influência desses medicamentos em animais diabéticos, e sua ausência em animais normoglicêmicos poderia ser as alterações observadas nos níveis séricos de GIP, GLP-1 e outros substratos da DPP-4, assim como em seus receptores no estado de hiperglicemia observadas em estudos experimentais e clínicos (Ilhan *et al.*, 2010; Kjemis *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2011; Turner, Burr, 1993), sendo que estes medicamentos podem apresentar sua ação potencializada nos indivíduos diabéticos (Glorie *et al.*, 2014).

Em nosso estudo avaliamos inicialmente a influência dos medicamentos no peso dos animais; tendo como base estudos que observaram a perda ou redução de ganho de peso em animais e indivíduos que faziam uso de sitagliptina e exenatida (Horton *et al.*, 2010; Vilsboll *et al.*, 2012; Ottney, 2013; Carrington *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2014; Kishimoto, Noda, 2014). Nossos achados corroboram os da literatura, uma vez que tanto a exenatida quanto a sitagliptina diminuíram o ganho de peso dos animais em 14 e 29 dias, como esperado. O efeito no peso decorrente do uso tanto dos inibidores da DPP-4 quanto dos agonistas do GLP-1R está relacionado, na literatura, a estimulação dos receptores de GLP-1, embora todos os mecanismos envolvidos nesta regulação não tenham sido totalmente elucidados (Marathe *et al.*, 2013; Van Bloemendaal *et al.*, 2014).

O consumo de alimentos é regulado por dois mecanismos: homeostático e não-homeostático. O sistema homeostático controla o equilíbrio energético ajustando o consumo alimentar para promover estabilidade na quantidade de energia armazenada. Esse sistema inclui reguladores hormonais de fome, saciedade e dos níveis de adiposidade, tais como a leptina, grelina e a insulina, que atuam em circuitos cerebrais hipotalâmicos e do tronco cerebral, estimulando ou inibindo o apetite, conforme a necessidade, para que se mantenha o balanço energético. O mecanismo não-homeostático está relacionado ao sistema de recompensa cerebral, de forma que os alimentos saborosos são consumidos não se levando em consideração o balanço energético. Muitas vezes os mecanismos não-homeostáticos podem se sobrepor aos homeostáticos, levando ao ganho de peso. No entanto alguns reguladores homeostáticos hormonais podem influenciar o sistema de recompensa cerebral diminuindo a palatabilidade e o valor de recompensa de um alimento, dependendo da necessidade energética (Van Bloemendaal *et al.*, 2014).

Acredita-se que o GLP-1 age em ambos os mecanismos de regulação da fome, tanto direta quanto indiretamente. A ação direta ocorre através da liberação do hormônio na corrente sanguínea, levando ao maior aproveitamento da insulina no fígado e maior produção de insulina (conhecida por ter propriedades anoréxicas) no pâncreas. O hormônio também pode cruzar a barreira hematoencefálica e se ligar com receptores em áreas do cérebro relacionadas com o controle do consumo de alimento e equilíbrio energético, como a área tegmental central, núcleo accumbens e o hipotálamo, que vão reforçar a ação deste hormônio no fígado, pâncreas, e agir também no tecido adiposo marrom aumentando a ação termogênica e retardando o esvaziamento gástrico, assim prolongando a sensação de saciedade (Lockie *et al.*, 2012; Van Bloemendaal *et al.*, 2014). A ação indireta do GLP-1 se daria através da estimulação dos neurônios eferentes do nervo vago que estimulam neurônios produtores de GLP-1 no núcleo do trato solitário no bulbo raquidiano, parte do sistema nervoso central (SNC) relacionada ao paladar e secreção salivar. Nesta parte do SNC, o GLP-1 age diminuindo a fome relacionada a mecanismos não-homeostáticos. Os sinais eferentes também estimulam as partes do cérebro relacionadas ao controle energético da fome como citado anteriormente. Todas essas vias levam à diminuição do consumo de alimentos (Figura 19) (Berthoud, 2008; Lockie *et al.*, 2012; Van Bloemendaal *et al.*, 2014).

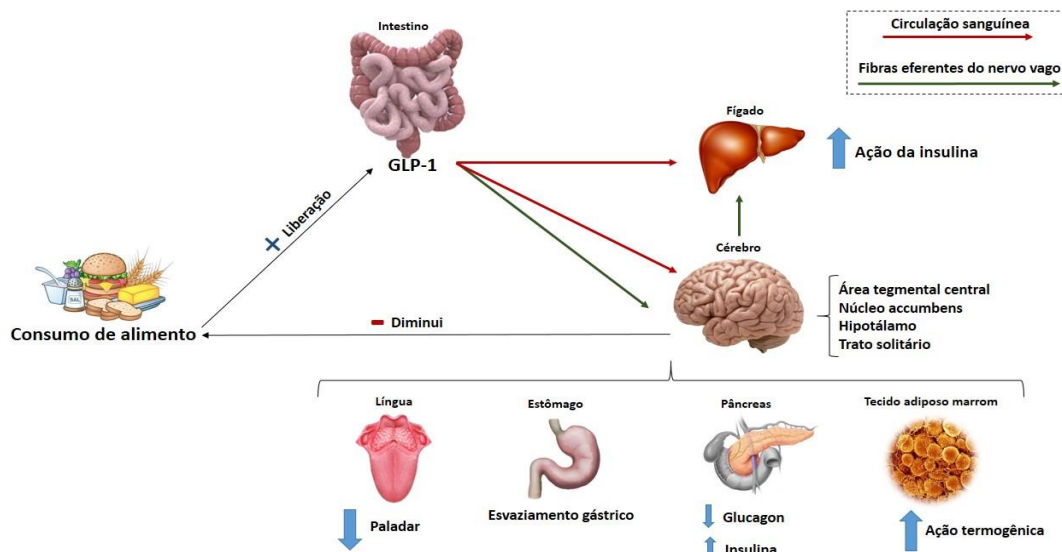


Figura 19 - A ingestão de alimentos leva a liberação de GLP-1 pelo intestino. O GLP-1 liberado age diretamente através da circulação porta no fígado, aumentando a ação da insulina. O GLP-1 presente na circulação também pode cruzar a barreira hematoencefálica e se ligar a receptores específicos em áreas do cérebro responsáveis pela regulação do consumo de alimento (área tegmental central, núcleo accumbens, hipotálamo e trato solitário). Essas regiões do tronco encefálico vão estimular: língua, diminuindo o paladar; estômago, retardando o esvaziamento gástrico; pâncreas, estimulando a liberação de insulina e suprimindo a liberação de glucagon; e tecido adiposo marrom, aumentando sua ação termogênica. Todas essas ações diretas e indiretas levam à diminuição do consumo de alimento e consequente perda de peso. Figura adaptada do artigo *Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS* (Van Bloemendaal et al., 2014). Imagens copiadas da internet*.

Nós também avaliamos a ação dos medicamentos na glicemia de jejum dos ratos normoglicêmicos, e constatamos ausência de influência em todos os grupos, concordando com outros trabalhos que avaliaram a glicemia em ratos não-diabéticos (Nuche-Berenguer *et al.*, 2009, 2010; Shah *et al.*, 2011; Glorie *et al.*, 2014). Essa observação está de acordo com estudos que demonstram que os análogos do GLP-1 estimulam a secreção endógena de insulina de uma maneira fisiológica dependente de glicose. Assim sendo, na ausência de um quadro de hiperglicemia, as incretinas não agem na liberação de insulina pelo pâncreas e consequentemente não influenciam na glicemia (Jiang *et al.*, 2011).

* Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/osteologiageneralidades.htm> (osso); <http://clikaki.com.br/quais-os-fatores-de-risco-da-hipertensao/> (vaso); [http://emgeraldadidasassuncao.webnode.com.br/products/anatomia-humana-i/\(Coração\);](http://emgeraldadidasassuncao.webnode.com.br/products/anatomia-humana-i/(Coração);) <http://saude.hsw.uol.com.br/sistema-digestivo2.htm> (intestino); <http://genoma.ib.usp.br/wordpress/?p=4726> (cérebro).

O teste ELISA foi realizado para avaliar os efeitos dos medicamentos nas concentrações das incretinas, avaliando-se os seus mecanismos de ação. Pode-se medir a concentração total dos hormônios ou de suas porções intactas. Os hormônios intactos correspondem aos peptídeos inteiros biologicamente ativos, antes de serem degradados pela DPP-4; já os valores totais correspondem a todas as isoformas (incluindo as inativas) e produtos de degradação desses peptídeos. Após a administração da sitagliptina verificou-se diminuição da concentração de DPP-4 associada à diminuição de GIP e manutenção dos níveis de GLP-1. Trabalhos na literatura têm observado a diminuição dos valores totais de GIP e GLP-1 após administração de inibidores da DPP-4, enquanto os valores dos hormônios intactos estão aumentados (Deacon *et al.*, 2002; El-Ouaghlidi *et al.*, 2007; Waget *et al.*, 2011; Nishii *et al.*, 2014; Ostrovskaya *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). A explicação destes autores para tal achado seria a presença de um *feedback* negativo. Os valores de GIP e GLP-1 intactos aumentados e exercendo a sua função, após o uso do medicamento estimulariam o pâncreas a diminuir a produção de mais hormônios em suas isoformas ativas e inativas resultando num valor total diminuído. Assim, os autores têm utilizado os valores totais de GIP e GLP-1 diminuídos como indicadores de aumento dos valores dos peptídeos ativos aumentados (Deacon *et al.*, 2002; El-Ouaghlidi *et al.*, 2007; Waget *et al.*, 2011; Nishii *et al.*, 2014; Ostrovskaya *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Alguns resultados obtidos por nós são intrigantes; a diminuição da concentração de GIP observada no grupo GE não era esperada, sendo que não encontramos na literatura explicação para tal fato. Do mesmo modo, a sitagliptina não influenciou os valores totais de GLP-1, não os diminuindo como esperávamos. Diferentemente de outros kits disponíveis no mercado que disponibilizam informações sobre quais porções dos peptídeos estão sendo mensuradas, o kit utilizado por nós não fornecia tais informações. Após contato com o fabricante obtivemos a informação de que se tratava de um kit de mensuração de valores totais desses

hormônios. Outros kits mais específicos poderiam gerar resultados mais confiáveis.

No teste ELISA, confirmamos ainda o resultado esperado após o uso da exenatida, que não influenciou os valores de GLP-1, dado que é um agonista sintético do GLP-1R, com apenas 50% de homologia. A inibição da DPP-4 ocorreu com o uso da sitagliptina e a diminuição do ganho de peso dos animais comprova o efeito do medicamento. Do mesmo modo, que a eficácia da exenatida é comprovada pela diminuição do ganho de peso dos animais.

As radiografias intra-orais são as ferramentas diagnósticas mais utilizadas na clínica para a determinação da perda óssea alveolar causada pela periodontite. A avaliação radiográfica tem a vantagem de ser um método barato e de rápida execução (Pryor *et al.*, 2006), motivo pelo qual este método foi empregado em nosso estudo. No entanto, esta análise possui a limitação de fornecer uma representação bidimensional de uma estrutura tridimensional. A imagem radiográfica do osso interproximal é influenciada pela angulação da peça em relação ao feixe de raios-X, e este posicionamento pode gerar uma imagem bidimensional que não é fiel a situação tridimensional (Sewerin *et al.*, 1987). Uma maneira eficaz de diminuir o viés relacionado à angulação entre o dente e o feixe de raios-X é a utilização de posicionadores e padronização. Outra variável que pode influenciar os resultados das análises radiográficas é a definição dos pontos de referências anatômicos que serão considerados na avaliação da perda óssea (Hausmann, 2000; Wolf *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Neste estudo os pontos anatômicos de referência foram selecionados por um único observador treinado, a fim de manter a maior padronização possível da escolha dos pontos de referência. A análise radiográfica da periodontite em ratos mede basicamente um defeito intraósseo proximal, enquanto que na análise histológica é realizada uma medida de perda óssea horizontal ou da área de perda óssea (Klausen *et al.*, 1989) sendo, portanto, análises

complementares. Além disso, nas radiografias avaliamos a peça sem desmineralização, diferentemente do que ocorreu na análise microscópica.

A análise histológica é considerada o padrão-ouro para avaliação de perda óssea alveolar, juntamente com a microtomografia computadorizada. Neste estudo não foi observada diferença entre os grupos que receberam medicamento e o grupo DP nas análises histomorfométricas, confirmando os achados radiográficos. Nossos resultados concordam com o encontrado por outros autores como Cusick *et al.* (2013), Gallagher *et al.* (2014) e Glorie *et al.* (2014), que não observaram alterações nas análises histomorfométricas e no número de osteoblastos e osteoclastos após a administração de inibidores da DPP-4. Em contrapartida, Ma *et al.* (2013) observaram um aumento do número de osteoblastos e diminuição no número de osteoclastos, assim como aumento na taxa de formação e aposição óssea após administração de exenatida.

Nós também avaliamos a influência desses medicamentos na quantidade de colágeno, com base em estudos com animais *knockout* (tanto para GIP quanto para GLP-1) que apresentavam diminuição na maturidade do colágeno (Mieczkowska *et al.*, 2013, 2015) e em estudos que evidenciaram que a administração do GIP em ratos aumentou a maturidade do colágeno (Mabilleau *et al.*, 2014). A sitagliptina e a exenatida também têm demonstrado ação anti-inflamatória, diminuindo a liberação de citocinas (Cechin *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2012), COX-2 (Schuermann *et al.*, 2012) e espécies reativas do oxigênio (Chaudhuri *et al.*, 2012; Shiraki *et al.*, 2012). No entanto, diferentemente do que esperávamos não houve diferença na quantidade de colágeno entre os grupos testes e controle.

A DPP-4, além de sua função enzimática na degradação das incretinas, também pode se apresentar como receptor de membrana, sendo nesta forma conhecida como CD26 (Meester *et al.*, 1999). A CD26/DPP-4 possui um papel importante na resposta inflamatória, uma

vez que e a sua ativação aumenta a maturação e migração de células T, secreção de citocinas, produção de anticorpos, estimulação de células B produtoras de imunoglobulinas e ativação de células T citotóxicas (Boonacker, Van Noorden, 2003; Ohnuma *et al.*, 2008). Foi sugerido que a CD26/DPP-4 também é capaz de degradar colágeno, através da ativação de MMP-9, facilitando assim o tráfego de células através da matriz extracelular (MEC) (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2001). Adicionalmente a CD26/DPP-4 se liga ao plasminogênio, aumentando os níveis de plasmina, que degrada o colágeno tipo 4, fibronectinas, laminina e proteoglicanos, além de ativar as MMPs, acentuando assim a degradação da MEC (Itou, 2013). Deste modo, ao administrar um inibidor da DPP-4 esperávamos que este modulasse a resposta inflamatória, inibindo a ativação e produção de MMP e reduzindo a perda de colágeno.

Do mesmo modo, a exenatida têm demonstrado ação anti-inflamatória, diminuindo a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Chung *et al.*, 2009; Cechin *et al.*, 2012; Chaudhuri *et al.*, 2012), inclusive na inflamação induzida por LPS (Lee *et al.*, 2012) como é o caso da doença periodontal. Devido a esta característica, somada a sua influência no tecido ósseo comprovada por trabalhos *in vitro* e *in vivo* esperávamos uma melhora do quadro inflamatório durante a periodontite induzida. No entanto, isso não ocorreu, e para tentar explicar o porquê nós levantamos as seguintes hipóteses:

- a) A inibição da DPP-4 e a ativação de GLP-1R pode não ter sido suficiente para sobrepor os efeitos bacterianos. Sabe-se que a doença periodontal é infecciosa e que as bactérias apresentam seus próprios fatores de virulência, que além de interferirem com a resposta do hospedeiro, levam por si só à degradação do tecido periodontal; e pode ter ocorrido que a redução da resposta inflamatória do hospedeiro

não foi suficiente para modular a doença (Boonacker, Van Noorden 2003). Portanto, a realização de um modelo experimental, no qual se realiza também a raspagem, removendo o gatilho da doença, poderia evidenciar melhor os resultados com o uso dos medicamentos;

- b) 2) A DPP-4 age em vários órgãos e substratos, por diversos mecanismos, sendo que estes poderiam ser antagônicos e a própria inibição da DPP-4 levar a ativação de alguma via que levaria ao agravamento do processo inflamatório (Boonacker, Van Noorden, 2003);
- c) 3) A coexpressão da CD26/DPP-4 com outras enzimas pode formar complexos compensatórios levando a uma ação de cooperação na execução de tarefas. Portanto, deve ser entendido que, no caso de inibição específica da atividade da CD26/DPP-4, uma substituição funcional pode interferir com os resultados esperados. Este fenômeno pode explicar a razão do porquê a linhagem de ratos Fisher 344 que apresenta ausência de expressão de CD26/DPP-4 só apresentam patologias do aparato digestivo, sem influência em outros órgãos (Tiruppathi *et al.*, 1993);
- d) 4) O GLP-1 apresenta ação no sistema nervoso simpático (SNS), o que pode antagonizar sua ação direta no osso. Em estudos em que se administrou GLP-1 diretamente no SNC observou-se aumento da pressão sanguínea e frequência cardíaca (Bojanowska, Stempniak,

2000; Isbil-Buyukcoskum, Gulec, 2004; Osaka *et al.*, 2005). Essas respostas estão relacionados à ativação do sistema nervoso simpático. A ativação de receptores de GLP-1 no cérebro de ratos mostrou-se capaz de aumentar a geração de sinais nos neurônios pré-ganglionares do SNS, aumentando os níveis plasmáticos de catecolaminas, hormônios relacionados ao estresse (Yamamoto *et al.*, 2002). Adicionalmente, durante a sua ação na perda de peso, os agonistas do GLP-1 agem aumentando os níveis séricos de leptina (Lepsen *et al.*, 2014) sendo que esta tem sido relacionada a perda óssea (Sharan, Yadav, 2014). Um papel simpato-excitatório do GLP-1 no SNC têm sido proposto (Ghosal *et al.*, 2013) e pesquisas recentes têm constatado o importante papel do SNS na regulação do metabolismo ósseo, levando à perda óssea (Sharan, Yadav, 2014). Além de seu papel estimulatório do estresse, o GLP-1 e a exenatida têm sido relacionados com a liberação de corticosterona (Tauchi, *et al.*, 2008; Gil-Lozano *et al.*, 2014), que modula a resposta ao estresse. Porém, a exposição prolongada aos glicocorticoides pode levar à osteoporose, sendo a principal causa de osteoporose iatrogênica (Rosan, 2008).

Estudos relacionando a importância do SNS com a progressão da periodontite também têm sido realizados. Okada *et al.* (2010), administraram propranolol (antagonista β -adrenérgico, inibidor do SNS) em ratos com periodontite induzida por *Porphyromonas gingivalis*, e

observaram que o propranolol inibiu a diferenciação osteoclástica. Da mesma forma, Rodrigues *et al.* (2012) observaram a mesma resposta após a administração de propranolol em ratos com periodontite induzida por ligadura. Os autores sugerem que o efeito de baixas doses de β -bloqueadores no osso se dá parcialmente pela inibição inflamatória (IL-1 β e TNF- α) e inibição da osteoclastogênese. Nosso grupo também vêm estudando a ação do SNS no desenvolvimento da doença periodontal; em trabalho prévio utilizando isoproterenol (agonista β -adrenérgico) observou-se o agravamento da perda óssea lingual em ratos com periodontite induzida por ligadura (Martins, 2011). Esses achados claramente demonstram um papel do SNS na patogênese da doença periodontal. Portanto, a ativação do SNS pela exenatida pode suprimir os efeitos benéficos esperados deste medicamento (Pérez-Tilve *et al.*, 2010), sendo que a ativação das vias autonômicas centrais podem ser um efeito colateral dos agonistas do GLP-1 (Yamamoto *et al.*, 2003). Todos os mecanismos de ação das incretinas ainda não foram completamente elucidados, sendo que alguns deles podem ter efeitos antagônicos. A Figura 20 ilustra a hipótese que levantamos da ação antagônica do GLP-1 no tecido ósseo.

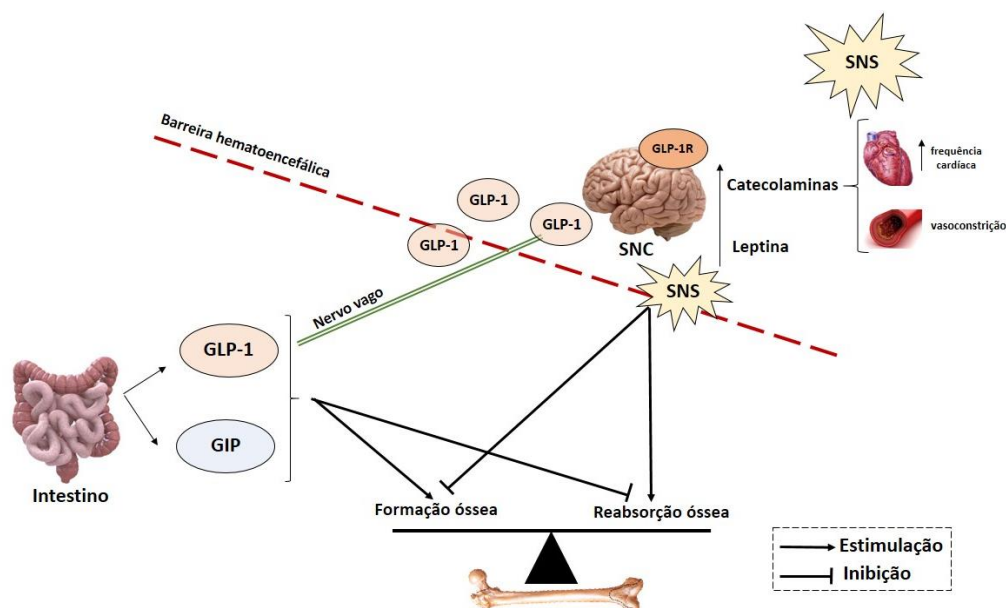


Figura 20 - Ação hipotética periférica e central do GLP-1 na modulação do metabolismo ósseo. O intestino frente a um desafio glicêmico libera os hormônios GIP e GLP-1. Esses hormônios apresentam ação anabólica comprovada em estudos *in vitro* e *in vivo* em animais *knockout*. O GLP-1 produzido no intestino pode chegar ao cérebro de forma passiva rompendo a barreira hematoencefálica ou pode excitar as fibras do nervo vago que induzem liberação de GLP-1 no cérebro. Uma vez ligado ao seu receptor cerebral o GLP-1 possui ação excitatória sobre o sistema nervoso simpático (SNS), aumentando a liberação de catecolaminas, que induzem uma resposta de estresse no hospedeiro, levando ao aumento da frequência cardíaca e vasoconstrição. O GLP-1 também induz o aumento da leptina circulante. A ativação do SNS é conhecida por suas ações maléficas sobre o tecido ósseo levando à reabsorção. Portanto, o GLP-1 demonstra ação anabólica no osso, quando age diretamente neste tecido; no entanto, quando age a nível de sistema nervoso, sua ação estimulatória sobre o SNS poderia levar a maior reabsorção óssea. Imagens copiadas da internet*.

Ma *et al.* (2013), que estudaram a influência da exenatida em ratas ovariectomizadas, observaram que esse medicamento preveniu a osteopenia, apesar da possível influência do SNS citada acima. No entanto, o estresse é um fator de risco reconhecido para doença periodontal (Genco, Borgnakke, 2013), agravando o seu estado (Lu *et al.*, 2014). O mesmo não parece acontecer com a osteoporose, que não apresenta o estresse entre os seus fatores de risco (Tella, Gallagher, 2014) e parece ser menos susceptível a esse sistema do que a doença

* Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/osteologiageneralidades.htm> (osso); <http://clikaki.com.br/quais-os-fatores-de-risco-da-hipertensao/> (vaso); <http://emgeraldadassuncao.webnode.com.br/products/anatomia-humana-i/> (Coração); <http://saude.hsw.uol.com.br/sistema-digestivo2.htm> (intestino); <http://genoma.ib.usp.br/wordpress/?p=4726> (cérebro).

periodontal. Deste modo, estudos que avaliam a ação concomitante do GLP-1 no tecido ósseo e na estimulação do sistema nervoso simpático são necessários para comprovar a hipótese de ação antagônica deste hormônio no tecido ósseo.

Adicionalmente foi constatada a presença de *Porphyromonas gingivalis* no biofilme formado ao redor dos dentes com ligadura em ratos (Duarte *et al.*, 2010). A *P.gingivalis* produz endotoxinas que a auxiliam na sua invasão e estabelecimento nos tecidos do hospedeiro, sendo que, dentre essas endotoxinas encontra-se a DPP-4 (Abiko *et al.*, 1984; Kumagai *et al.*, 2005). A DPP-4 oriunda da *P.gingivalis* (DPP-4Pg) é capaz de ativar as MMPs do hospedeiro (DeCarlo *et al.*, 1997) e se ligar a fibronectina, que auxilia na colonização e penetração desta bactéria nos tecidos do hospedeiro, influenciando no processo de reparo da inflamação (Kumagai *et al.*, 2005). A presença de CD26/DPP-4 no tecido periodontal de pacientes com periodontite crônica foi constatada (Kennet *et al.*, 1996), assim como, o seu nível no fluido crevicular gengival está diretamente relacionado com indicadores da severidade da doença periodontal em pacientes não tratados e estes são reduzidos após o tratamento periodontal (Cox, Eley, 1992). Esses fatos indicam que a CD26/DPP-4 está envolvida no processo de patogênese da doença periodontal.

Assim sendo, estudos *in vitro* para constatar se a sitagliptina é capaz de inibir a DPP-4Pg seria uma outra possibilidade de ação local deste medicamento na doença periodontal, driblando as possíveis interferências sistêmicas.

Estudos *in vitro* comprovam a presença de receptores tanto de GIP quanto de GLP-1 nas células ósseas, e estudos *in vivo* realizados com animais *knockout* comprovam a ação desses hormônios na regulação do metabolismo ósseo (Yabe, Seino, 2013). No entanto, a falta de influência desses medicamentos no osso alveolar pode evidenciar

que a ação desses hormônios no metabolismo ósseo é muito mais complexa do que imaginamos.

7 CONCLUSÃO

Ao fim do estudo constatamos que:

- a) Os medicamentos não influenciaram a glicemia quando administrados em ratos normoglicêmicos;
- b) Ambos os medicamentos impediram o ganho de peso nos animais tratados, demonstrando a ação dos mesmos;
- c) Tanto a exenatida quanto a sitagliptina não influenciaram o suporte ósseo alveolar radiográfico;
- d) Os medicamentos também não influenciaram a perda óssea microscópica na região distal e da furca do 1º molar inferior;
- e) Sitagliptina e exenatida não influenciaram a quantidade de fibras colágenas sobre a crista óssea distal;
- f) A sitagliptina diminuiu a concentração sérica de DPP-4 e de GIP, porém não influenciou os níveis de GLP-1.

Portanto, os medicamentos utilizados não foram efetivos na estabilização e recuperação da periodontite em ratos.

8 REFERÊNCIAS*

Abiko Y, Hayakawa M, Murai S, Takiguchi H. Glycylprolyl Dipeptidylaminopeptidase from *Bacterioides gingivalis*. J Dent Res. 1984 Feb;64(2):106-11.

Aemaimanan P, Sattayasai N, Wara-aswapati N, Pitiphat W, Suwannarong W, Prajane S, et al. Alanine aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in saliva of chronic periodontitis patients. J Periodontol. 2009 Nov;80(11):1809-14.

American Academy of periodontology. Glossary of periodontal terms [internet]. Chicago: The American Academy of Periodontology; 2001. 4. ed. [acesso em 25 Dez 2014]. Disponível em: www.perio.org/sites/default/files/files/PDFs/Publications/GlossaryOfPeriodontalTerms2001Edition.pdf.

Amori RE, Lau J, Pittas LJ. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes - Systematic review and meta-analysis. JAMA. 2007 Jul; 298(2):194-206.

Anbinder AL, Prado Mde A, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. Braz Dent J. 2006;17(3):201-7.

Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterol. 2007 May;132(6):2131-57.

Berthoud HR. The vagus nerve, food intake and obesity. Regul Pept. 2008 Aug;149(1-3):15-25.

Bojanowska E, Stempniak B. Effects of centrally or systemically injected glucagon-like peptide-1 (7–36) amide on release of neurohypophysial hormones and blood pressure in the rat. Regul Pept. 2000;91(1-3):75–81.

Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, et al. Osteoblast-derived cells express functional glucose dependent insulinotropic peptide receptors. Endocrinology. 2000 May;141(3):1228-35.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, et al. Glucose-dependent insulintropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 May;177(1-2):35-41.

Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol*. 2003 Feb;82(2):53-73.

Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2012 May;83(5):664-71.

Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. 1993 Dec;143(6):1699-712.

Carrington MJ, Chan YK, Stewart S, Sjouke B, Brazilek R, Cohen N. Long-term tolerance and efficacy of adjunctive exenatide therapy on glycaemic control and bodyweight in type 2 diabetes: a retrospective study from a specialist diabetes outpatient clinic. *Intern Med J*. 2014 Apr;44(4):345-53.

Cechin SR, Pérez-Álvarez I, Fenjves E, Molano RD, Pileggi A, Berggren P O, et al. Anti-inflammatory properties of exenatide in human pancreatic islets. *Cell Transplant*. 2012;21(4):633-48.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. Trendings in aging-United States and Worldwide. *MMWR*. 2003;52:101-6.

Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, Sia CL, Korzeniewski K, Dhindsa S, et al. Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jan;97(1):198-207.

Chung LTK, Hosaka T, Yoshida M, Harada N, Sakaue H, Sakai T, et al. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec;390(3):613-8.

Cox SW, Eley BM. Cathepsin B/L, elastase, tryptase, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid. A comparison of levels before and after basic periodontal treatment of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1992 May;19(5):333-9.

Cusick T, Mu J, Pennypacker BL, Li Z, Scott KR, Shen X, et al. Bone loss in the oestrogen-depleted rat is not exacerbated by sitagliptin, either alone or in combination with a thiazolidinedione. *Diabetes Obes Metab.* 2013 Oct;15(10):954-7.

Dalcico R, de Menezes AM, Deocleciano OB, Oriá R B, Vale M L, Ribeiro RA, et al. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *J Periodontol.* 2013 Aug;84(8):1145-57.

Davidson MB, Bate G, Kirkpatrick P. Exenatide. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Sep;4(9):713-4.

Deacon CF, Wamberg S, Bie P, Hughes TE, Holst JJ. Preservation of active incretin hormones by inhibition of dipeptidyl peptidase IV suppresses meal-induced incretin secretion in dogs. *J Endocrinol.* 2002 Feb;172(2):355-62.

DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 1997 Jun;76(6):1260-70.

DeFronzo, RA. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009 Apr;58(4):773-95.

Ding KH, Shi XM, Zhong Q, Kang B, Xie D, Bollag WB, et al. Impact of glucose-dependent insulinotropic peptide on age-induced bone loss. *J Bone Min Res.* 2008 Apr;23(4):536-543.

Drucker DJ, Buse JB, Taylor K, Kendall DM, Trautmann M, Zhuang D, et al. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet.* 2008 Oct;372(9645):1240-50.

Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010 Feb;55(2):142-7

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012 Oct;91(10):914-20.

El-Ouaghli A, Rehring E, Holst JJ, Schweizer A, Foley J, Holmes D, et al. The dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin does not accentuate glibenclamide-induced hypoglycemia but reduces glucose-induced glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4165-71.

Gaudin-Audrain C, Irwin N, Mansur S, Flatt PR, Thorens B, Baslé M, et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor deficiency leads to modifications of trabecular bone volume and quality in mice. *Bone*. 2013 Mar;53(1):221-30.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):59-94.

Gil-Lozano M, Romaní-Pérez M, Outeiriño-Iglesias V, Vigo E, González-Matías LC, Brubaker PL, et al. Corticotropin-releasing hormone and the sympathoadrenal system are major mediators in the effects of peripherally administered exendin-4 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Endocrinology*. 2014 Jul;155(7):2511-23.

Ghosal S, Myers B, Herman JP. Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. *Physiol Behav*. 2013 Oct 2;122:201-7.

Glorie L, Behets GJ, Baerts L, De Meester I, D'Haese PC, Verhulst A. DPP IV inhibitor treatment attenuates bone loss and improves mechanical bone strength in male diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep;307(5):E447-55.

Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, Gawdi G, Pizzo SV. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J*. 2001 Apr 15;355(Pt 2):397-407.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan;3.

Gupta V. Pleiotropic effects of incretins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012 Mar;16(1):S47-56.

Gurav AN. Periodontitis and insulin resistance: casual or causal relationship? *Diabetes Metab J*. 2012 Dec;36(6):404-11.

Hatwal A. Inflammation and incretins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012 Dec;16(2):S239-41.

Hansen, HH, Hansen G, Paulsen S, Vrang N, Mark M, Jelsing J, et al. The DPP-IV inhibitor linagliptin and GLP-1 induce synergistic effects on body weight loss and appetite suppression in the diet-induced obese rat. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct;741:254-63.

Hausmann E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):497-503.

Horton ES, Silberman C, Davis KL, Berria R. Weight loss, glycemic control, and changes in cardiovascular biomarkers in patients with type 2 diabetes receiving incretin therapies or insulin in a large cohort database. *Diabetes Care*. 2010 Aug;33(8):1759-65.

International Diabetes Federation-IDF [internet]: Brussels: International Diabetes Federation [acesso 31 Out 2014]. Disponível em: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>

Ilhan A, Rasul S, Dimitrov A, Handisurya A, Gartner W, Baumgartner-Parzer S, et al. Plasma neuropeptide Y levels differ in distinct diabetic conditions. *Neuropeptides*. 2010 Dec;44(6): 485–9.

Isbil-Buyukcoskun N, Gulec G. Effects of intracerebroventricularly injected glucagon-like peptide-1 on cardiovascular parameters: Role of central cholinergic system and vasopressin. *Regul Pept*. 2004;118(1-2):33–8.

Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. Dipeptidylpeptidase-4: a key player in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2013 Apr 21;19(15):2298-306.

Jiang J, Zhang J, Jacobsen LV, Hu P. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, after multiple subcutaneous administration in healthy Chinese male subjects. *J Clin Pharmacol*. 2011 Dec;51(12):1620-7.

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014 Nov;93(11):1045-53.

Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Histochemical and immunocytochemical localization of dipeptidyl peptidases II and IV in human gingiva. *J. Periodontol*. 1996;67(9):846–52.

Kerbaui WDLF, Perrella FA, Amorim JBO. Advanced glycation end products (AGE) and the exacerbation of periodontal disease in diabetic patients- Review. *Periodontia*. 2008;18(3):20-7.

Kim TS, Benn DK, Eickholz P. Accuracy of computer-assisted radiographic measurement of interproximal bone loss in vertical bone defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Sep;94(3):379-87.

Kim JY, Lee SK, Jo KJ, Song DY, Lim DM, Park KY, et al. Exendin-4 increases bone mineral density in type 2 diabetic OLETF rats potentially through the down-regulation of SOST/sclerostin in osteocytes. *Life Sci*. 2013 Mar;92(10):533-40.

Kishimoto M, Noda M. Effects of exenatide in a morbidly obese patient with type 2 diabetes. *Diabetes Ther*. 2014 Jun;5(1):323-32.

Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 2003 Feb;52(2):380-6.

Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res*. 1989 Dec;97(6):494-9.

Kruger DF, Bode B, Spollett GR. Understanding GLP-1 Analogs and enhancing patient success. *Diabetes Educ*. 2010 Jul-Ago;36 Supp 3:44S-72S.

Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced By the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2005 May;73(5):2655-64.

Kyle KA, Willett TL, Baggio LL, Drucker DJ, Grynepas MD. Differential effects of PPAR-gamma activation versus chemical or genetic reduction of DPP-4 activity on bone quality in mice. *Endocrinology*. 2011 Feb;152(2):457-67.

Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):13-9.

Lee YS, Park MS, Choung J S, Kim SS, Oh HH, Choi CS, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012 Sep;55(9):2456-68.

Lepsen EW, Lundgren J, Dirksen C, Jensen JE, Pedersen O, Hansen T, et al. Treatment with a GLP-1 receptor agonist diminishes the decrease in free plasma leptin during maintenance of weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2014 Oct 7.[Epub ahead of print].

Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2753-62.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med*. 2014 Oct 17;46:e118.

Lund A, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Jun;300(6):E1038–46.

Ma X, Meng J, Jia M, Bi L, Zhou Y, Wang Y, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2013 Jul;28(7):1641-52.

Mabilleau G, Mieczkowska A, Chappard D. Use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and bone fractures: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Diabetes*. 2014 May;6(3):260-6.

Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, et al. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *Clin Endocrinol Metab*. 2012 Sep;97(9):3333-41.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Relationships between gastric emptying, postprandial glycemia, and incretin hormones. *Diabetes Care*. 2013 May;36(5):1396-405.

Marques C, Mega C, Gonçalves A, Rodrigues-Santos P, Teixeira-Lemos E, Teixeira F, et al. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:538737.

Martins LG. Influência do sistema nervoso simpático na periodontite induzida e em glândula salivar de ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2011.

McIntosh CHS, Widenmaier S, Kim S-J. Pleiotropic actions of the incretin hormones. *Vitam Horm.* 2010;84:21-79.

Meester I, Korom S, Damme JV, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today.* 1999 Aug;20(8):367-75.

Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, Chappard D, Mabileau G. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor deletion leads to reduced bone strength and quality. *Bone.* 2013 Oct;56(2):337-42.

Mieczkowska A, Mansur S, Bouvard B, Flatt PR, Thorens B, Irwin N, et al. Double incretin receptor knock-out (DIRKO) mice present with alterations of trabecular and cortical micromorphology and bone strength. *Osteoporos Int.* 2015;26(1):209-18.

Monami M, Dicembrini I, Antenore A, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Care.* 2011 Nov;34(11):2474-6.

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia.* 2009 Jan;52(1):17-30.

Neumiller JJ. Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc (2003).* 2009 Sep-Oct;49(1):S16-29.

Nishii N, Takashima S, Iguchi A, Murahata Y, Matsuo A, Hikasa Y, et al. Effects of sitagliptin on plasma incretin concentrations after glucose administration through an esophagostomy tube or feeding in healthy cats. *Domest Anim Endocrinol.* 2014 Oct;49:14-9.

Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapía S, Caeiro JR, Cancelas J, et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int.* 2009 Jun;84(6):453-61.

Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Núñez S, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Peptides.* 2010 Jan;159(1-3):61-6.

Nuche-berenguer B, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, Moreno P, Mariñoso ML, Esbrit P, et al. GLP-1 and exendin-4 can reverse hyperlipidic-related osteopenia. *J Endocrinol*. 2011 May;209(2):203-10.

Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting na old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol*. 2008 Jun;29(6):295-301

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S, et al. Blockade of sympathetic b-receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol*. 2010 Jul;55(7):502-8.

Osaka T, Endo M, Yamakawa M, Inoue S. Energy expenditure by intravenous administration of glucagon-like peptide-1 mediated by the lower brainstem and sympathoadrenal system. *Peptides*. 2005 Sep;26(9):1623-31.

Ostrovskaya RU, Zolotov NN, Ozerova IV, Ivanova EA, Kapitsa IG, Taraban KV, et al. Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Jul;157(3):344-9.

Ottney A. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for weight loss in adult patients without diabetes. *Am J Health Syst Pharm*. 2013 Dec;70(23):2097-103.

Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJ, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*. 2011;11:12.

Pérez-Tilve D, González-Matías L, Aulinger BA, Alvarez-Crespo M, Gil-Lozano M, Alvarez E, et al. Exendin-4 increases blood glucose levels acutely in rats by activation of the sympathetic nervous system. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 May;298(5):E1088-96.

Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol*. 2006 Jun;33(6):455-60.

Pugazhenthii U, Velmurugan U, Tran K, Mahaffey G, Pugazhenthii S. Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients. *Diabetologia*. 2010 Nov;53(11):2357-68.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2007 Mar;22(3):659-61.

Rizzo MR, Barbieri M, Marfella R, Paolisso G. Reduction of oxidative stress and inflammation by blunting daily acute glucose fluctuations in patients with type 2 diabetes: role of dipeptidyl peptidase-IV inhibition. *Diabetes Care*. 2012 Oct;35(10):2076-82.

Rodrigues WF, Madeira MF, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012 Apr;165(7):2140-51.

Rosan CJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Washington: ASBMR; 2008.

Sb brasil [internet]: Brasília: Pesquisa nacional de saúde bucal- Ministério da saúde [acesso em 31 Out 2014]. Disponível em: http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf

Schürmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, Steinmetz C, Mark M, Pfeilschifter J, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates inflammation and accelerates epithelialization in wounds of diabetic ob/ob mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jul;342(1):71-80.

Sewerin I, Andersen V, Stoltze K. Influence of projection angles upon position of cemento-enamel junction on radiographs. *Scand J Dent Res*. 1987 Feb;95(1):74-81.

Shah Z, Kampfrath T, Deilüis JA, Zhong J, Pineda C, Ying Z, et al. Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis. *circulation*. 2011 Nov;124(21):2339-49.

Sharan K, Yadav VK. Hypothalamic control of bone metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014 Oct;28(5):713-23.

Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):375-82.

Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD [internet]. São Paulo: SBD [acesso em 02 Nov 2014]. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/>

Tauchi M, Zhang R, D'Alessio DA, Seeley RJ, Herman JP. Role of central glucagon-like peptide-1 in hypothalamo-pituitary-adrenocortical facilitation following chronic stress. *Exp Neurol*. 2008 Apr;210(2):458-66.

Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Periodontol*. 2013 Apr;40 suppl14:S113-34.

Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Jul;142:155-70.

Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 1):G81-9.

Tomkin, GH. Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors. *World J Diabetes*. 2014 Oct;5(5):636-50.

Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2014 Sep;63(9):1141-8.

Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, et al. Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol*. 2006 Jul;20(7):1644-51.

Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993 Jun-Jul;14(4):595-608.

Van Bloemendaal L, Ten Kulve JS, la Fleur SE, Ijzerman RG, Diamant M. Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: focus on the CNS. *J Endocrinol*. 2014 Apr;221(1):T1-16.

Vilsbøll T, Christensen M, Junker AE, Knop FK, Gluud LL. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *Brit Med J*. 2012 Jan;344:d7771.

Waget A, Cabou C, Masseboeuf M, Cattan P, Armanet M, Karaca M, et al. Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice. *Endocrinology*. 2011 Aug;152(8):3018-29.

Wallis K, Walters JR, Forbes A. Review article: glucagon-like peptide 2-current applications and future directions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Feb;25(4):365-72.

Wang T, Gou Z, Wang F, Ma M, Zhai SD. Comparison of GLP-1 analogues versus sitagliptin in the management of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of head-to-head studies. *PLoS One.* 2014;9(8):e103798.

Wolf B, von Bethlenfalvy E, Hassfeld S, Staehle HJ, Eickholz P. Reliability of assessing interproximal bone loss by digital radiography: intrabony defects. *J Clin Periodontol.* 2001 Sep;28(9):869-78.

Wong IP, Baldock PA, Herzog H. Gastrointestinal peptides and bone health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010 Feb;17(1):44-50.

Wu T, Ma J, Bound MJ, Checklin H, Deacon CF, Jones KL, et al. Effects of sitagliptin on glycemia, incretin hormones, and antropyloroduodenal motility in response to intraduodenal glucose infusion in healthy lean and obese humans and patients with type 2 diabetes treated with or without metformin. *Diabetes.* 2014 Aug;63(8):2776-87.

Yabe D, Seino Y. Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 Dec;13(6):946-53.

Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology.* 2008 Feb;149(2):574-9.

Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(1):43-52.

Yamamoto H, Kishi T, Lee CE, Choi BJ, Fang H, Hollenberg AN, et al. Glucagon-like peptide-1- responsive catecholamine neurons in the area postrema link peripheral glucagon-like peptide-1 with central autonomic control sites. *J Neurosci.* 2003 Apr 1;23(7):2939-46.

Yavropoulou MP, Yovos JG. Incretins and bone: evolving concepts in nutrient-dependent regulation of bone turnover. *Hormones (Athens).* 2013 Apr-Jun;12(2):214-23.

Zhong Q, Itokawa T, Sridhar S, Ding KH, Xie D, Kang B, et al. Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *Endocrinol Metab.* 2007 Feb;292(2):E543-8.

ANEXO A- Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
 Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Al. São Diniz
 CEP 12201-908 - F. (12) 3457-9028
 Fax: (12) 3043-9010 / campus@frc.unesp.br

CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **04/2013-PA/CEP**, sobre
 "Efeitos da exenatida e da sitagliptina na periodontite induzida em
 ratos", sob a responsabilidade da Profa.Assist.Dra. **ANA LIA**
ANBINDER, tendo como orientadas as alunas **RENATA MENDONÇA**
MORAES, **KÁSSIA PAULINO** E **ANA CAROLINA VALIM DE BRITO**,
 está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal,
 adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – **CONCEA**
 e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 23 de agosto de 2013.


 Profa.Adjunto **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**
 Vice-Coordenadora em exercício

Serão utilizados 40 ratos Wistar com 60 dias