

LUANA GALVÃO MARTINS

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA
PERIODONTITE INDUZIDA E EM GLÂNDULA SALIVAR DE
RATOS**



2011

LUANA GALVÃO MARTINS

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA
PERIODONTITE INDUZIDA E EM GLÂNDULA SALIVAR DE RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 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

2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco

Departamento de Odontologia
Universidade de Taubaté – UNITAU

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 29 de junho de 2011.

Dedico este trabalho aos meus amores:

À minha mãe, **Maria Lúcia Galvão Martins**, pessoa de fé, que sempre acreditou em mim e demonstrou seu amor incondicional.

Ao meu pai, **João Maria Rennó Martins**, uma pessoa de caráter inquestionável, que demonstra de modo particular todo seu imenso amor.

À minha querida irmã, **Camila Galvão Martins**, pelo carinho, amizade e também por arrumar minhas bagunças.

Ao meu noivo, **Felipe Alejandro Bastidas Molina**, por ser meu maior incentivador, deixando muitas vezes de lado seus projetos por acreditar em mim. Amo-te incondicionalmente, e tenho a certeza de que sempre estaremos verdadeiramente um ao lado do outro.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Adj. José Roberto Rodrigues**, e ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade de realização do curso Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À minha orientadora, **Profa. Dra Ana Lia Anbinder**, exemplo de profissional dedicada, por me ensinar a ser uma pesquisadora, pela amizade, carinho e por sempre me mostrar o caminho da excelência, por mais difícil que seja.

Aos docentes do Programa de Biopatologia Bucal, pela colaboração e ensinamentos transmitidos, em especial às professoras: **Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, **Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha** e **Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes** pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus amigos **Mônica Ghislaine Oliveira Alves**, **Guilherme Rodrigues Teodoro**, **Gabriela de Moraes Gouvea Lima** e **Maria José Domingues de Castro**, que nunca mediram esforços para me ajudar. Agradeço pela amizade, carinho e disposição.

Aos **colegas do Programa de Pós-graduação**, que compartilharam comigo inúmeras felicidades e angústias no decorrer do curso, agradeço por suas contribuições em todos os momentos.

Às queridas alunas de Iniciação Científica **Carolina Servidoni Spreafico**, **Poliana Giacomini Tanobe** e **Talita Angelina Aureliano Tavares**, que descobriram comigo algumas pedras no caminho da ciência, com a certeza de que foi bom não estar sozinha.

Aos funcionários do Biotério **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos** e **Marco Antônio Alfredo**, por sua dedicação com os animais e pela convivência alegre.

Aos técnicos de laboratório **Walter Cruz** e **Maria Salete Faria**, por todo cuidado e atenção durante a preparação do material histológico.

Aos **funcionários da FOSJC-UNESP**, que sempre me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.

Às meninas do CEBAPE, pela ajuda nos momentos difíceis.

À **Pró-reitoria de Pesquisa (PROPe)** pelo apoio financeiro para realização deste trabalho

Aos **animais experimentais**, seres cujas vidas foram sacrificadas em benefício e progresso da ciência, com a certeza de não ter sido em vão; a eles, o meu profundo respeito.

É com a certeza de que sozinha nunca teria conseguido chegar até aqui, agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indireta contribuíram possibilitando a finalização deste trabalho. Levarei todos no meu coração por toda vida.

Dedicação é a capacidade de se entregar à realização de um objetivo. Não conheço ninguém que tenha progredido na carreira sem trabalhar pelo menos doze horas por dia nos primeiros anos. Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes. Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá de se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo. Se quiser um casamento gratificante, terá de investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo. O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem. Mas, para conseguir um resultado diferente da maioria, você tem de ser especial. Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados. Não se compare à maioria, pois, infelizmente, ela não é modelo de sucesso. Se você quiser atingir uma meta especial, terá de estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas. Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão. Terá de trabalhar, enquanto os outros tomam sol à beira da piscina. A realização de um sonho depende da dedicação. Há muita gente que espera que o sonho se realize por magia. Mas toda magia é ilusão. A ilusão não tira ninguém do lugar onde está. Ilusão é combustível de perdedores.

Roberto Shinyashiki

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Sistema Nervoso x Fisiologia Óssea.....	20
2.2 Doença Periodontal.....	26
2.2.1 Doença Periodontal x Sistema Nervoso Simpático.....	28
2.3 Glândula Salivar x Sistema Nervoso Simpático x Periodontite	29
3 PROPOSIÇÃO.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específica.....	33
4 MATERIAL E MÉTODO.....	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Grupos experimentais.....	34
4.3 Indução da doença periodontal.....	35
4.4 Peso corporal dos animais.....	36
4.5 Eutanásia dos animais.....	36
4.6 Análise radiográfica do suporte ósseo alveolar.....	37
4.7 Análise macroscópica da perda óssea alveolar.....	37
4.8 Análise histométrica das glândulas submandibular e sublingual.....	40
4.9 Delineamento experimental e análise estatística.....	41

4.9.1 Parte I: Influência da doença periodontal em glândula salivar	42
4.9.2 Parte II: Efeito do tratamento com Propranolol ou Isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução da DP.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Parte I: Influência da doença periodontal em glândula salivar	44
5.1.1 Peso Corporal.....	44
5.1.2 Suporte ósseo alveolar.....	45
5.1.3 Perda óssea alveolar lingual.....	45
5.1.4 Medida das glândulas salivares.....	47
5.1.5 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula submandibular	48
5.1.6 Vacuolização na glândula submandibular.....	49
5.1.7 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula sublingual....	49
5.1.8 Análise descritiva em HE.....	50
5.2 Parte II: Efeito do tratamento com propranolol ou isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução de doença periodontal.....	52
5.2.1 Peso Corporal.....	52
5.2.2 Suporte ósseo alveolar.....	53
5.2.3 Perda óssea alveolar lingual.....	53
5.2.4 Medida das glândulas salivares.....	55
5.2.5 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula submandibular	56
5.2.6 Vacuolização na glândula submandibular.....	57
5.2.7 Análise descritiva em HE.....	57
6 DISCUSSÃO.....	60
6.1 Parte I- Influência da Doença Periodontal em glândula salivar	60

6.2 Parte II: Efeito do tratamento com Propranolol ou Isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução da Doença Periodontal	63
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do isoproterenol.....	22
Figura 2 - Fórmula estrutural do propranolol.....	24
Figura 3 - Metodologia do trabalho: a) Inserção da ligadura para indução da DP; b) Eutanásia dos animais: Glândulas salivares sublingual (⇔) e submandibular (⇔); c) Radiografia marcada com os pontos A, B e C para mensuração do suporte ósseo pelo programa ImageJ; d) Aspecto macroscópico da perda óssea alveolar lingual em hemimandíbula direita mostrando a distância linear entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar na região média raízes mesial, mediana e distal.....	39
Figura 4 – Médias, desvios-padrão e estatística inferencial referentes aos valores porcentagem de suporte ósseo mesial (Parte I)	46
Figura 5 - Esquema dos cinco números (Boxplot) e estatística inferencial referentes aos valores de perda óssea alveolar lingual (Parte I).....	46
Figura 6 – Parênquima da glândula salivar. Glândula submandibular exibindo grande quantidade de células acinares (⇔), ductos granulares (⇔) e estriados (►). HE. a) Grupo C-SL: barra=100µm. b) Grupo C-L: barra=50µm. c) Glândula sublingual corada em <i>alcian blue</i> , barra=50µm.....	51
Figura 7 – Médias, desvios-padrão e estatística inferencial referentes aos valores porcentagem de suporte ósseo alveolar (Parte II)	54

Figura 8 - Esquema dos cinco números (Boxplot) e estatística inferencial referentes aos valores perda óssea alveolar lingual (Partell).....	54
---	----

Figura 9 – Aspecto da glândula submandibular nos diferentes grupos: a) Grupo C-L e b) Grupo PRO: Ácinos e ductos com aspecto de normalidade e notável presença de vacúolos (g). c) Grupo ISO: Células acinares hipertrofiadas com citoplasma mais homogêneo que nos demais grupos.....	59
--	----

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Condições experimentais analisadas na Parte I	42
Quadro 2 - Condições experimentais analisadas na Parte II	43
Tabela 1 - Estatística descritiva referente aos dados de porcentagem de ganho de peso (Parte I)	44
Tabela 2 - Estatística descritiva referentes às medidas das glândulas salivares (Parte I).....	47
Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados de porcentagem de área de ácinos e ductos em glândula submandibular (Parte I)	48
Tabela 4 - Estatística descritiva do número de ácinos com células vacuolizadas por campo histológico (400x) em glândula submandibular (Parte I)	49
Tabela 5 - Estatística descritiva dos dados de porcentagem de área ocupada por muco e ductos em glândula sublingual (Parte I)	50
Tabela 6 - Estatística descritiva e inferencial referente aos dados de porcentagem de ganho ou perda de peso (Parte II)	52
Tabela 7 - Estatística descritiva e inferencial referentes aos dados medidas das glândulas salivares (Parte II)	55
Tabela 8 - Estatística descritiva e inferencial referentes aos dados de porcentagem de área de ácinos e ductos em glândula submandibular (Parte II)	56

Tabela 9 - Estatística descritiva do número de ácinos com células vacuolizadas por campo histológico (400x) em glândula submandibular (Parte II)	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-L= Grupo controle com ligadura
C-SL= Grupo controle sem ligadura
DP = Doença Periodontal
gl= Grau de Liberdade
HE = Hematoxilina e Eosina
IL = Interleucina
IL-6= Interleucina-6
iNO= óxido nítrico sintetase induzível
ISO= Grupo Isoproterenol
LPS = Lipopolissacarídeos
mRNA = Ácido Ribonucléico mensageiro
PCNA = Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PGE2= prostaglandina E2
PRO= Grupo Propranolol
RANK = Receptor Ativador de NF-Kappa B
RANKL = Ligante do Receptor Ativador do Fator NF-Kappa B
sham = Simulação de Cirurgia
SNS= Sistema Nervoso Simpático
TNF α = Fator de Necrose Tumoral
TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC
nick end-labeling
UNESP = Universidade Estadual Paulista

Martins LG. Influência do sistema nervoso simpático na periodontite induzida e em glândula salivar de ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A ação de beta-bloqueadores na melhoria da qualidade óssea e sua ação anti-inflamatória embasam a hipótese de que a modulação simpática pode influenciar a evolução da doença periodontal (DP). Estudos demonstram relação entre disfunção salivar e DP; no entanto, os efeitos da DP nas glândulas salivares, cuja secreção é controlada pelo sistema nervoso autônomo, são pouco estudados. Objetivou-se analisar os efeitos do bloqueio e da ativação de receptores beta-adrenérgicos na reabsorção alveolar na DP em ratos, assim como os efeitos da DP, associada ou não a tratamento adrenérgico, nas glândulas salivares. Foram utilizados 40 ratos divididos em quatro grupos: (1) Grupo Propranolol 0,1mg/Kg com indução de DP; (2) Grupo Isoproterenol 0,75mg/Kg e DP; (3) Grupo Controle sem DP, com administração solução fisiológica ; (4) Grupo Controle com DP, com administração solução fisiológica. Depois de 14 dias de tratamento, ocorreu a eutanásia. Removeram-se as hemimandíbulas e as glândulas submandibulares e sublinguais para análise. O suporte e a perda óssea alveolar foram determinados radiográfica e macroscopicamente. As glândulas foram pesadas, medidas e submetidas à preparação de rotina para coloração com hematoxilina e eosina e *Alcian Blue*. Avaliou-se histomorfometricamente a área de ácinos, ductos e a vacuolização celular. Após estatística ($p<0,05$), verificou-se menor suporte e maior perda alveolar na presença de ligadura e maior perda alveolar em animais com tratados com isoproterenol. O isoproterenol aumentou significativamente peso e dimensões glandulares, reduziu área ductal e vacuolização, e aumentou área acinar na submandibular. Propranolol apenas reduziu vacuolização em relação ao controle com DP, e as demais comparações não foram estatisticamente significantes. Concluiu-se que a estimulação simpática agravou a DP, porém não houve alteração pelo bloqueio beta adrenérgico. A associação entre DP e isoproterenol levou às alterações glandulares significativas, como hipertrofia acinar e redução da área ocupada por ductos.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Simpático. Receptores Adrenérgicos. Propranolol. Isoproterenol. Periodontite. Glândula Submandibular.

Martins LG. *Adrenergic neuromodulation during periodontal disease induction and its effects in rats salivary glands [dissertation]*. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The action of beta-blockers in the improvement of bone quality and their anti-inflammatory actions base the hypothesis that sympathetic nervous system modulation can influence periodontal disease (PD). Studies demonstrate a relationship between salivary dysfunction and PD; however, there are few studies about the effects of PD in salivary glands, whose secretion is controlled by the autonomic nervous system. The aim of this study was to analyze the effects of the blockade and of the activation of beta-adrenergic receptors in alveolar resorption in PD in rats, as well as the effects of PD, associated or not to adrenergic treatment, in salivary glands. Forty rats were divided into four groups: (1) group Propranolol 0.1mg/Kg with PD induction; (2) group Isoproterenol 0.75mg/Kg and PD; (3) group Control without PD, which received saline; (4) group Control with PD, which also received saline. After 14 days of treatment, euthanasia occurred. Hemimandibles and submandibular and sublingual glands were removed for analysis. Alveolar bone support and alveolar bone loss were evaluated by radiographic and macroscopic analysis. Gland weight and dimensions were measured, and then the samples were submitted to routine preparation for hematoxylin and eosin and Alcian blue stainings. Acinar and ductal area and cellular vacuolization were histomorphometrically evaluated. After statistical analysis ($p < 0.05$), less alveolar bone support and larger alveolar loss were verified in animals with ligatures for PD induction and larger alveolar loss were also verified in rats treated with isoproterenol. Isoproterenol also increased significantly glandular weight, size and acinar area, and reduced ductal area and cellular vacuolization in submandibular glands. Group Propranolol presented less vacuolization than group Control with DP. Other comparisons were not statistically significant. It was concluded that the sympathetic stimulation worsened PD, however, it was not influenced by adrenergic blockade. The association between PD and isoproterenol resulted in significant effects in salivary glands, as acinar hypertrophy and reduction of ductal area.

Keywords: Sympathetic nervous system. Adrenergic receptors. Propranolol. Isoproterenol. Periodontal diseases. Submandibular gland.

1 INTRODUÇÃO

Periodontite pode ser definida como inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, geralmente com progressão destrutiva, levando a perda óssea e destruição do ligamento periodontal, ou ainda, como extensão da inflamação da gengiva ao tecido ósseo e ligamento periodontal adjacente (The American Academy of Periodontology, 2001). O controle da resposta do hospedeiro na periodontite é um campo de pesquisa muito amplo, várias terapias têm sido propostas para a modulação da resposta inflamatória e imune, cujos alvos são a redução da produção e atividade de metaloproteinases de matriz e da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico (principalmente prostaglandinas), regulação do metabolismo ósseo (Oringer, 2002), redução da produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e da síntese de óxido nítrico (Salvi, Lang, 2005).

Recentemente, alguns novos conceitos sobre o papel do sistema nervoso na fisiologia óssea e na modulação da inflamação e reparação têm surgido. As terminações nervosas têm sido encontradas em direto contato com as células ósseas, e axônios contendo catecolaminas têm sido identificados próximos a osteoblastos *in vivo*, sugerindo uma regulação neuroendócrina da remodelação óssea (Serre et al., 1999).

Pesquisas genéticas e farmacológicas que relacionam a estimulação ou inibição do sistema nervoso simpático e o tecido ósseo têm sido realizadas, proporcionando resultados importantes para o entendimento da regulação da remodelação óssea, e para o tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose (Karsenty, Ducky, 2006; Kim et al., 2009). Tais pesquisas baseiam-se no entendimento dos mecanismos

de transmissão química do sistema nervoso simpático, de sua ação nos diversos órgãos e das várias maneiras pelas quais se pode interferir farmacologicamente neste processo.

Receptores β -adrenérgicos são expressos em uma grande variedade de tecidos, onde são importantes reguladores da função, como no coração, pulmão, vasos, sistema endócrino e sistema nervoso central. Os agonistas dos receptores β -adrenérgicos têm sido utilizados em muitas situações clínicas; todavia hoje desempenham importante papel principalmente no tratamento da broncoconstrição em pacientes com asma ou com doença pulmonar obstrutiva crônica. O isoproterenol é um potente agonista β -adrenérgico não seletivo, com afinidade muito baixa pelos receptores α , e é utilizado em emergências para estimular a frequência cardíaca em pacientes com bradicardia ou bloqueio cardíaco. Em casos de asma e choque, o isoproterenol foi substituído, em parte, por outros simpaticomiméticos (Goodman, Gilman, 2007). Os bloqueadores dos receptores β -adrenérgicos, por sua vez, representam uma importante classe de agentes terapêuticos para os problemas cardiovasculares e vários outros estados patológicos. O propranolol, o primeiro agente bloqueador β a ser aprovado nos Estados Unidos, é considerado o protótipo dos antagonistas não seletivos (Yagiela et al., 2000).

Todas as glândulas salivares apresentam inervação parassimpática, com liberação de acetilcolina que se liga a receptores muscarínicos, levando à secreção acinar. A maioria das glândulas possui também inervação simpática, adrenérgica, com liberação da secreção proteica armazenada, principalmente pelas células acinares, mas também pelas células ductais (Proctor, Carpenter, 2007).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado relação entre disfunção salivar e periodontite (Hirotomi et al., 2006; 2008), evidenciando que a homeostase oral depende da saliva e seu conteúdo protéico. No

entanto, os efeitos da periodontite nas glândulas salivares ainda não estão claros.

Desta maneira, pretende-se entender a ação do sistema nervoso simpático na patogênese da doença periodontal (DP), avaliando a possibilidade do uso de bloqueadores β -adrenérgicos como tratamento modulador da resposta do hospedeiro em casos de periodontite, além de determinar os efeitos da periodontite, associada ou não aos tratamentos com propranolol e isoproterenol, em glândula salivar de ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Nervoso x Fisiologia Óssea

A existência dos receptores adrenérgicos α e β , foi proposta no final da primeira metade do século XX e estudos subsequentes indicaram que os receptores α -adrenérgicos poderiam ser divididos em dois subtipos α_1 e α_2 , enquanto os receptores β -adrenérgicos, em três grupos, β_1 , β_2 e β_3 (Rang et al., 2007). As respostas que se seguem à ativação de todos os tipos de receptores adrenérgicos parecem resultar dos efeitos mediados pela proteína G na produção de segundos mensageiros e na atividade dos canais iônicos (Goodman, Gilman, 2007).

Tradicionalmente, o controle da remodelação óssea é associado a mecanismos autócrinos/ parácrinos (citocinas, fatores de crescimento e prostaglandinas), hormonais (paratormônio, 1,25 diidroxivitamina D3, calcitonina, glicocorticoides, esteroides sexuais e hormônios tireoidianos) e mecânicos. No entanto, estudos histológicos têm mostrado que tanto o osso como o periósteo recebem um rico suprimento de fibras nervosas sensoriais e simpáticas (Takeda et al., 2002; Kondo, Togari, 2003; Chenu, 2004).

Os principais estudos descrevendo os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos no esqueleto foram iniciados após a descoberta de que a leptina era um inibidor central da formação óssea (Takeda et al., 2002; Bonnet et al., 2008). A leptina, hormônio que é secretado pelas células adiposas em resposta à insuficiência energética, age numa população de neurônios localizados no hipotálamo

ventromedial, que por sua vez estimula a atividade das fibras nervosas simpáticas intra-ósseas (Takeda et al., 2002). Essas fibras liberam noradrenalina, que se ligam aos receptores adrenérgicos expressos nos osteoblastos, inibindo sua atividade de formação óssea. Além disso, a estimulação de receptores β_2 leva a produção de RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator NF-Kappa B) pelos osteoblastos, contribuindo para um equilíbrio mineral ósseo negativo (Elefteriou et al., 2005), principalmente trabecular (Hamrick, Ferrari, 2008). O sistema nervoso simpático, através dos receptores β_2 -adrenérgicos presentes nos osteoblastos, é o mediador eferente da função antiosteogênica da leptina, unindo o hipotálamo aos ossos (Karsenty, Ducky, 2006). Camundongos sem receptores β_2 , homozigotos para os alelos que codificam a característica (β_2 -/-), assim como camundongos deficientes em leptina, apresentam um fenótipo de massa óssea aumentada, mas sem alterações endócrinas e metabólicas (Karsenty, Ducky, 2006). Camundongos deficientes para receptores adrenérgicos β_1 e β_2 apresentam uma importante inibição dos índices de formação óssea, particularmente na superfície periosteal (Pierroz, 2005). Isso sugere que o maior índice de formação óssea observado nos animais deficientes apenas para o receptor β_2 pode estar relacionado a receptores β_1 funcionantes. Considerando que os receptores β_1 não são expressos no osso, é possível que a sinalização β_1 adrenérgica possa estimular a formação óssea indiretamente, ou sistemicamente, diferentemente dos efeitos inibitórios indiretos da sinalização β_2 adrenérgica nos osteoblastos (Bonnet et al., 2008).

Além dos efeitos diretos nos receptores das células ósseas, o sistema nervoso simpático pode causar alguns efeitos indiretos no osso, como a regulação do suprimento sanguíneo, pois fibras nervosas estão frequentemente associadas a vasos sanguíneos e em muitos tecidos, neuromediadores carregados pelo sistema nervoso simpático controlam o fluxo sanguíneo. É possível também que os neuromediadores

liberados pelas fibras nervosas controlem as funções ósseas indiretamente através da regulação da expressão de citocinas pelas células do sistema imune (Chenu, 2004).

Apesar das evidências da participação do sistema adrenérgico na regulação da remodelação óssea, os experimentos farmacológicos têm produzido resultados controversos (Bonnet et al., 2008), possivelmente devido à ação simpática em diferentes níveis, desde o sistema nervoso central até as células ósseas (Reid, 2008). Em tais estudos, são utilizados agonistas e antagonistas adrenérgicos, como isoproterenol e o propranolol, medicamentos que serão testados em nossa pesquisa.

O Isoproterenol, com fórmula estrutural observada na Figura 1, pertence ao grupo das catecolaminas, que são compostos que contêm um catecol (anel de benzeno com dois grupos de hidroxila adjacentes). Do ponto de vista farmacológico, as catecolaminas mais importantes são: noradrenalina (norepinefrina), adrenalina (epinefrina), dopamina e isoprenalina (isoproterenol), um derivado sintético da noradrenalina não encontrado no organismo. O isoproterenol foi utilizado como um broncodilatador em tratamento de asma, mas atualmente está sendo substituído pelo salbutamol, devido a efeitos indesejáveis, que são taquicardia e arritmia (Rang et al., 2007).

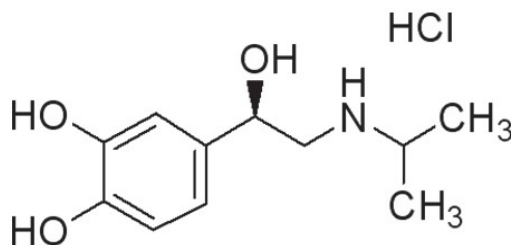


Figura 1 - Fórmula estrutural do isoproterenol.

Zeman et al. (1991) estudaram o efeito da administração de clenbuterol na água de beber (8,5 mg/l), em ratas ovariectomizadas e observaram que o uso deste simpaticomimético preveniu a redução da mineralização óssea em 35% no fêmur e em 25% na tíbia. Diferentemente, Bonnet et al. (2005a), ao analisarem os efeitos dos agonistas β -adrenérgicos salbutamol e clenbuterol sobre a massa óssea de ratos, observaram efeitos negativos na microarquitetura do osso trabecular, sendo que o clenbuterol reduziu ainda mais a densidade mineral óssea. Segundo Kondo e Togari (2011), o tratamento contínuo com isoprenalina, em intervalo de doses de 5 a 100 mg/kg/dia, durante duas semanas, reduziu a massa óssea em camundongos. O recente estudo mostrou que o medicamento causou aproximadamente 35,7% de diminuição da fração de volume do osso do fêmur e enfraquecimento das propriedades mecânicas da quarta vértebra lombar em todas as doses. Em análise histológica, observaram aumento no número de osteoclastos, principalmente nas doses menores. Os autores sugerem que dose baixa de isoprenalina em tratamento contínuo induz à perda óssea devido ao aumento da atividade dos osteoclastos

O propranolol, com fórmula estrutural observada na Figura 2, é um β -bloqueador não específico, e apresenta diversos efeitos fisiológicos, sendo eles diminuição da hipertensão, aumento dos níveis séricos do hormônio de crescimento, diminuição dos níveis de hormônio da tireóide e diminuição dos níveis do cálcio sérico (Minkowitz et al., 1991). Como o efeito do propranolol é antagônico ao do isoproterenol, acredita-se que este não tenha efeito na função das vias aéreas em indivíduos normais, porém em pacientes asmáticos podem provocar sibilos e até desencadear uma crise asmática aguda potencialmente grave ao abolir o efeito compensatório da adrenalina endógena (Rang et al., 2007).

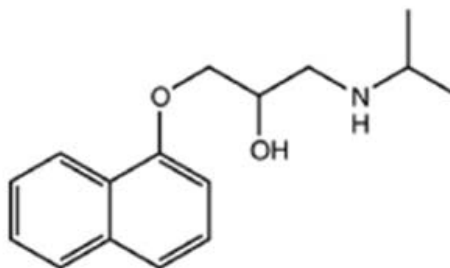


Figura 2 - Fórmula estrutural do propranolol.

Os efeitos benéficos do propranolol no osso foram descritos pela primeira vez por Minkowitz et al. (1991), no modelo de fratura em rato. Os autores concluíram que o tratamento com propranolol aumentou tanto a formação óssea como as propriedades de consolidação das fraturas.

No estudo de Pierroz et al. (2006), o uso de propranolol reduziu a perda óssea causada pela ovariectomia em ratos de uma maneira geral, em todo o corpo, mas não causou efeito significativo no fêmur ou vértebras. No mesmo estudo, a administração concomitante de paratormônio e de propranolol causou efeito benéfico sinérgico no osso. Segundo Marenzana et al. (2007), no entanto, a administração do propranolol não foi suficiente para reduzir a perda óssea induzida por desuso em tíbias neurectomizadas de ratos.

Bonnet et al. (2006; 2008) verificaram o efeito dose-dependente do propranolol na prevenção da perda óssea causada por ovariectomia em ratos, sendo que as menores doses apresentaram os melhores resultados. Sato et al. (2010), que testou diferentes doses de propranolol em ratos, concluíram também que baixas doses do medicamento (0,1 e 1 mg / kg) preveniram a perda óssea e fragilidade biomecânica, sugerindo que o propranolol pode ser um candidato terapêutico para osteoporose através da ação dos bloqueio dos receptores β 2-adrenérgicos não seletivos.

Estudos *in vitro* e em animais estimularam a realização de pesquisas relacionadas ao uso de β -bloqueadores e perda óssea em humanos, cujos resultados também são inconclusivos, com evidências de associação positiva, negativa ou ausente entre o uso do medicamento e risco de fratura ou alteração da densidade mineral óssea. As diferentes razões da prescrição do medicamento e o uso concomitante de outras substâncias podem ser responsáveis pela diversidade de resultados (Reid, 2008).

Vários pesquisadores encontraram relação positiva entre uso de β -bloqueadores e redução do risco de fraturas em humanos (Schlienger et al., 2004; Bonnet et al., 2007; Meisinger et al., 2007). Em estudo caso-controle, que incluiu 30601 casos (pacientes com fratura) e 120819 controles, Schlienger et al. (2004) concluíram que o uso de β -bloqueadores, sozinhos ou em combinação com diuréticos tiazídicos, pode reduzir o risco de fraturas, sendo que pacientes com hipertensão e sob risco de osteoporose podem se beneficiar duplamente do tratamento β -bloqueador. Estima-se que 45% dos adultos idosos sofrem de doenças cardiovasculares e osteoporose (Bonnet et al., 2006).

A mesma conclusão foi alcançada por Meisinger et al. (2007), que realizaram um estudo prospectivo numa população de 1793 indivíduos, observando a ocorrência de fraturas em um período de 10 anos. Bonnet et al. (2007) atribuem a redução do risco de fraturas em usuários de β -bloqueadores à melhoria da densidade, micro e macro arquitetura óssea. Wiens et al. (2006) realizaram uma meta análise da literatura na tentativa de elucidar os efeitos de medicamentos anti-hipertensivos na ocorrência de fraturas. Os autores avaliaram 54 estudos publicados e observaram redução estatisticamente significativa na ocorrência de fraturas com o uso de β -bloqueadores e diuréticos tiazídicos. No entanto, sugerem novos estudos antes que tais medicamentos baratos possam ser utilizados também para melhoria do tecido ósseo.

Relação negativa entre uso de propranolol e melhoria da qualidade óssea foi encontrada por outros autores. Rejnmark et al. (2004), em um estudo transversal, caso-controle, avaliaram os efeitos de β -bloqueadores na remodelação óssea, densidade mineral óssea e risco de fratura numa população de 2016 mulheres na pré-menopausa. Na população estudada, 38 mulheres faziam uso de β -bloqueadores. O tratamento associou-se a um risco de fratura três vezes maior, sendo que as mulheres tratadas por mais de oito anos apresentavam o maior risco. As mulheres tratadas apresentavam também maiores níveis de osteocalcina, um marcador de formação óssea, que as demais, e não houve diferença entre a densidade mineral óssea do colo do fêmur ou da coluna lombar entre os grupos tratados e controle. Os autores concluíram que os β -bloqueadores podem reduzir a formação óssea e aumentar o risco de fratura. Reid et al. (2005) conduziram um estudo randomizado, placebo-controlado com 41 mulheres pós-menopáusicas, que receberam ou não 160mg/dia de propranolol. Os autores avaliaram marcadores de formação e reabsorção óssea no soro e na urina e verificaram que o propranolol reduz a atividade osteoblástica.

Outros autores encontraram, ainda, ausência de relação entre uso de β -bloqueadores e densidade mineral óssea e risco de fraturas (Levasseur et al., 2005; Reid et al., 2005).

2.2 Doença Periodontal

DP é a inflamação do tecido de suporte dos dentes. Normalmente com uma progressão destrutiva, levando a perda de massa óssea e ligamento periodontal, com extensão de inflamação da gengiva ao osso adjacente e ligamento (The American Academy of Periodontology, 2001). São infecções associadas a bactérias patogênicas

que colonizam a área subgengival (Nakajima et al., 2006) e que afetam entre 7-15% da população adulta (Busch et al., 2008). Além de representar a principal causa de perda dentária, a periodontite pode ainda agir como um fator modificador para a saúde sistêmica (Seymour et al., 2007).

Embora o biofilme bacteriano seja considerado como o agente etiológico primordial para o desenvolvimento da DP, a degradação tecidual é resultado, em parte, da ativação da resposta imuno-inflamatória local do próprio hospedeiro (Salvi, Lang, 2005). Lipopolissacarídeos (LPS) e endotoxinas, fatores pró-inflamatórios ativos presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, estão envolvidos na estimulação da reabsorção óssea (Barros et al., 2003). O estímulo bacteriano induz o hospedeiro à liberação de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas pró-inflamatórias e enzimas (Salvi, Lang, 2005). Estas substâncias estimulam os osteoblastos e células do estroma a expressarem RANKL levando, assim, a um desequilíbrio do metabolismo ósseo e à consequente reabsorção (Wada et al., 2006).

Excetuando-se as pesquisas relacionadas a estresse emocional, raros estudos avaliaram a ação do sistema nervoso simpático no periodonto. Wucherpfennig et al. (1990) verificaram a proliferação celular no reparo de feridas experimentais realizadas com eletrocautério na gengiva de ratos com ressecção do nervo alveolar inferior, remoção do gânglio alveolar superior e submetidos à cirurgia simulada. A denervação simpática aumentou significativamente a proliferação celular do epitélio, do compartimento fibroblástico e da crista óssea alveolar, enquanto a denervação sensorial apenas alterou a proliferação fibroblástica. Segundo os autores, a inervação simpática exerce um importante papel na regulação da proliferação celular no periodonto e a modulação farmacológica da atividade simpática pode levar futuramente a uma nova abordagem terapêutica da periodontite.

2.2.1 Doença Periodontal x Sistema Nervoso Simpático

Breivik et al. (2005) realizaram simpatectomia química com a substância neurotóxica 6-hidroxidopamina em ratos Fisher, nos quais posteriormente foi induzida periodontite por meio da inserção de ligadura ao redor do segundo molar superior. Após 49 dias de manutenção da ligadura, os animais foram sacrificados e verificou-se menor perda óssea alveolar nos animais simpatectomizados que no grupo controle. Segundo os autores, esta foi a primeira pesquisa a demonstrar que o sistema nervoso simpático está envolvido na patogênese da DP.

Kim et al. (2009) também estudaram a ação do sistema simpático no periodonto de ratos. Os autores dividiram os animais em três grupos: simpatectomia cervical, com remoção do gânglio cervical superior; controle, em que foi realizada a simpatectomia simulada (*sham*); e no terceiro grupo, os animais foram submetidos à cirurgia *sham* e foram inoculados com *Porphyromonas gingivalis*. Tanto a ganglionectomia cervical como a inoculação de *P. gingivalis* estimularam a perda óssea alveolar. Os animais simpatectomizados apresentaram maiores níveis de IL-1 α , TNF α e IL-6 nos tecidos gengivais que os demais grupos, sugerindo, que o sistema nervoso simpático está associado à prevenção da perda óssea alveolar.

Okada et al. (2010) analisaram a ação da administração do propranolol (1 mg/kg/dia) durante 22 dias, sobre perda óssea alveolar induzida pela infecção por *P. gingivalis* em ratos. O bloqueio de β -receptores nos tecidos periodontais pelo propranolol inibiu a diferenciação osteoclastos e preveniu a perda óssea alveolar causada pela infecção com *P. gingivalis*. O estudo histológico revelou que o número de osteoclastos detectado foi proporcional ao nível de perda óssea. Estes

resultados indicam que o sistema nervoso simpático está envolvido no desenvolvimento da periodontite e sugerem que a modulação do sinal de simpático por β -bloqueadores permite o controle do metabolismo do osso alveolar.

2.3 Glândula Salivar x Sistema Nervoso Simpático x Periodontite

A Saliva é o produto misto de três pares de glândulas salivares maiores, a parótida, submandibular e sublingual, bem como numerosas glândulas salivares menores, encontradas na submucosa. O sistema nervoso parassimpático inerva todas as glândulas salivares, sendo que a inervação simpática, adrenérgica, apresenta-se em grande parte das glândulas. A falta de estímulos, seja pela denervação autonômica ou por dieta líquida (redução de estímulos reflexos), assim como obstrução dos ductos salivares, leva à atrofia glandular (Proctor, Carpenter, 2007).

De acordo com Garrett (1987), Proctor e Carpenter (2007), a estimulação parassimpática é mediada por acetilcolina em combinação com peptídeos não colinérgicos; evoca a maior parte do fluxo secretado; provoca variáveis níveis de exocitose nas células salivares, mas é responsável pela maior secreção de mucina nas glândulas mucosas; induz a contração das células mioepiteliais e aumenta o fluxo sanguíneo glandular, como parte do reflexo salivar. Já a estimulação simpática é essencialmente mediada pela noradrenalina e age sobre as células que recebem impulso parassimpático, que tendem a produzir efeitos sinérgicos, mas exerce pouco efeito sobre a secreção das glândulas mucosas, como a sublingual; geralmente não causa muita mobilização de líquido, mas não inibem a secreção salivar; tende a

modular a composição da saliva, aumentando a exocitose a partir de células salivares; induz a contração das células mioepiteliais; exerce controle sobre o fluxo sanguíneo glandular, mas não como parte do reflexo salivar.

Tratamento com o agonista adrenérgico isoproterenol aumenta o volume glandular (Onofre et al., 1997) e tal medicamento pode ser considerado um sialogogo. O mecanismo detalhado de como a administração crônica de isoproterenol leva ao aumento glandular ainda não está claro, embora proliferação de células acinares e hipertrofia sejam hipóteses levantadas (Ochiai et al., 2002). Utilizando a anticorpo para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-FITC nick end-labeling) para avaliação da apoptose, Nascimento Pinto et al. (Nascimento Pinto et al., 2006) verificaram que a administração diária de isoproterenol promove morte celular pelo processo apoptótico, mas induz aumento proporcional na atividade proliferativa glandular para manutenção da estabilidade do número de células nos vários compartimentos da parótida de ratos. A administração de propranolol, por sua vez, é capaz de reduzir o volume e quantidade de proteínas secretadas em resposta ao isoproterenol (Beal, 2000).

Para evidenciar que a homeostase oral depende da saliva e seu conteúdo proteico, estudos epidemiológicos têm demonstrado relação entre periodontite e disfunção salivar. Indivíduos idosos com saliva viscosa ou redução do fluxo salivar são mais susceptíveis à progressão da DP que indivíduos de fluxo normal (Hirotomi et al., 2006; 2008). Por outro lado, outros trabalhos têm considerado a periodontite com fator de risco para doenças sistêmicas como diabetes, hiperlipidemias, aterosclerose e doenças hepáticas (Ekuni et al., 2010). No entanto, os efeitos da periodontite nas glândulas salivares ainda não estão claros.

Busch et al. (2008) avaliaram os efeitos da periodontite na secreção de mucina em extratos de glândula submandibular de ratos. Nos ratos com doença, houve aumento da secreção de mucina, que parece ser devido à ativação do sistema nervoso simpático, uma vez que tal secreção foi inibida por antagonistas β -adrenérgicos. Os autores sugerem que mediadores inflamatórios produzidos em decorrência da periodontite estejam envolvidos no mecanismo de ativação do sistema nervoso simpático.

Busch et al. (2009) investigaram a relação entre os mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, prostaglandinas e leucotrienos com a liberação de mucina e o sistema simpático na glândula submandibular de ratos com DP induzida por 22 dias. Este estudo confirmou a participação dos mediadores inflamatórios no processo de secreção basal de mucina em glândulas submandibulares de ratos com ligadura, mesmo com as glândulas não apresentando sinais de inflamação. Nos ratos com DP, houve maior presença de leucotrienos na submandibular, sendo esses mediadores possivelmente responsáveis pela a secreção de mucina e envolvidos no mecanismo de defesa oral em ratos com DP. A produção de leucotrienos em glândulas submandibular de ratos com periodontite foi diminuída na presença do atenolol (antagonista β 1-adrenérgico) e aumentada pelo isoproterenol. Concluiu-se que o mecanismo de liberação da mucina e leucotrienos estão fortemente relacionados e ambos são associados com a atividade β -adrenérgica.

Miozza et al. (2009) analisaram as diferenças na atividade da amilase em glândula parótida de ratos com e sem DP induzida por 22 dias. Descreveram aumento da estimulação de liberação de amilase nos animais com DP, que segundo os autores pode auxiliar na manutenção da fisiologia da cavidade oral. A DP levou a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e peptídeo intestinal vasoativo na glândula parótida, resultando na ativação de receptores em células acinares, induzindo o aumento de AMP cíclico e levando ao acréscimo basal da secreção de

amilase através do aumento da taxa de formação de vesículas transportadoras destinadas à superfície da célula.

Ekuni et al. (2010) induziram DP, por meio de inserção de ligadura ao redor do primeiro mandibular inferior, em ratos durante, quatro semanas. Foram avaliados níveis plasmáticos de metabólitos reativos de oxigênio e de fator de necrose tumoral α (TNF α), além de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para TNF α e apoptose nas glândulas submandibulares. Os animais com periodontite apresentaram maiores níveis plasmáticos de metabólitos do oxigênio e TNF α , maior vacuolização e mais células apoptóticas glandulares. Os autores sugerem que a vacuolização e a apoptose na submandibular estão relacionados ao desequilíbrio entre oxidação e mecanismos anti-oxidantes causado pela periodontite.

Amer et al. (2011) também avaliaram os efeitos da DP induzida por ligadura em glândula submandibular de ratos. Após sete dias de indução, os autores analisaram a quantidade de saliva secretada, quantidade de PGE2, atividade da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNO) e características histológicas da glândula submandibular. Nos animais com doença, verificaram-se menor secreção salivar, maiores conteúdo de PGE2 e atividade de iNO, edema periductal e redução da altura dos ductos granulares, sem no entanto alteração da estrutura acinar. Os autores acreditam que estímulos nervosos originados pela doença periodontal podem afetar a função glandular.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os efeitos do bloqueio e da ativação de receptores β -adrenérgicos na reabsorção óssea alveolar durante a indução da periodontite em ratos, assim como os efeitos da DP, associada ou não a tratamento adrenérgico, nas glândulas salivares dos animais.

3.2 Específica

- a) Determinar os efeitos da doença periodontal induzida em nas características histológicas da glândula submandibular e sublingual;
- b) Determinar os efeitos dos tratamentos com Propranolol ou Isoproterenol nas características histológicas da glândula submandibular, e no suporte e perda óssea alveolar durante a indução da DP.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPa) da FOSJC - UNESP sob o protocolo n° 006/2010-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Para este trabalho foram utilizados 40 ratos (machos) (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP, com aproximadamente noventa dias de idade, mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos que receberam o tratamento por 14 dias:

(1) Grupo Propranolol (PRO): dez animais em que foi induzida DP por meio de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e que receberam injeções subcutâneas de propranolol ((±)-*Propranolol hydrochloride* – Cód. P0884 – Sigma, St. Louis MO, EUA) (0,1mg/Kg/dia) (Minkowitz et al., 1991; Bonnet et al., 2006; Bonnet et al., 2008), diluído em soro fisiológico (NaCl 0,9%);

(2) Grupo Isoproterenol (ISO): dez animais em que foi induzida DP por meio de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e receberam injeções subcutâneas de isoproterenol ((-)-*Isoproterenol hydrochloride* – Cód. I6504 - Sigma, St. Louis MO, EUA) (0,75 mg/Kg/dia), diluído em soro fisiológico;

(3) Grupo Controle Sem Ligadura (C-SL): dez animais sem indução de DP, mas que sofreram manipulação da mesma maneira que os demais grupos e receberam injeções subcutâneas de solução fisiológica;

(4) Grupo Controle Com Ligadura (C-L): dez animais em que foi induzida DP por meio de ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores e receberam injeções subcutâneas de solução fisiológica.

4.3 Indução da doença periodontal

Todos os animais, previamente pesados, foram anestesiados com uma mistura de 13mg/kg de cloridrato de xilazina 2 % (Anasedan - Vetbrands, Paulínia SP, Brasil) com 33 mg/kg de cetamina base (Dopalen - Vetbrands, Paulínia SP, Brasil) por via intramuscular. Para indução da DP, realizada através da inserção de fio de seda preta 4-0 (Ethicon - Johnson & Johnson, São José dos Campos SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores dos animais, os ratos anestesiados foram imobilizados em mesa apropriada, na qual permanecem com a boca aberta. A amarria das pontas do fio permaneceu na superfície mesial do dente (Figura 3a). Nos animais do grupo C-SL não foi induzida DP, mas foram anestesiados e manipulados da mesma maneira que os demais. O tratamento medicamentoso, de acordo com o grupo, iniciou-se no dia seguinte ao da inserção da ligadura.

4.4 Peso corporal dos animais

Todos os animais foram identificados e pesados no dia da inserção da ligadura (Grupos PRO, ISO e C-L) ou simulação (Grupo C-L) (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final). Cada rato pesado em balança digital e o percentual de alteração do peso de cada um dos animais foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{Alteração de peso (\%)} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) \times 100}{\text{Peso Inicial}}$$

4.5 Eutanásia dos animais

Após 15 dias da inserção das ligaduras, foi realizada a eutanásia por dose excessiva de anestésico. As mandíbulas foram e armazenadas em formol a 10%. As glândulas submandibulares foram dissecadas juntamente com as sublinguais (Figura 3b), e o conjunto das duas glândulas foi pesado em balança digital e medido (comprimento, largura e espessura) com paquímetro, também digital, antes da fixação em formol 10%. As glândulas submandibulares foram medidas juntamente com as glândulas sublinguais, pois as mesmas são unidas anatomicamente. Cada análise que se segue foi realizada por um único examinador que desconhecia o grupo ao quais pertenciam as amostras. Quando pertinente, o examinador foi previamente calibrado.

4.6 Análise radiográfica do suporte ósseo alveolar

As hemimandíbulas direitas foram radiografadas em aparelho de raios X odontológico digital (65 kVp, 7 mA, Gendex 765 DC-Gendex Dentals) com distância foco-objeto de 30cm, tempo de exposição de 0,05s e incidência do feixe de RX por lingual. As peças foram posicionadas sobre o sensor com cera utilidade (Epoxiglass, Diadema SP, Brasil) objetivando-se o paralelismo entre as cúspides linguais e vestibulares, que deveriam estar sobrepostas na imagem radiográfica, assim como as raízes.

A porcentagem de suporte ósseo (Klausen et al., 1989) foi calculada de acordo com a fórmula:

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

Após as medidas das distâncias lineares entre o ápice da raiz distal e a ponta da cúspide distal (segmento AB), entre o ápice da raiz distal e o fundo do defeito / crista óssea na furca distal (segmento AC) e do ângulo entre estes dois segmentos (ângulo CÂB) (Figura 3c).

As medidas foram tomadas com o auxílio do programa computacional ImageJ 1.43 u (National Institute of Health, Bethesda MD, EUA).

4.7 Análise macroscópica da perda óssea alveolar

Para a análise macroscópica da perda óssea alveolar, após serem radiografadas, as hemimandíbulas direitas foram maceradas em hidróxido de sódio 2N por 23 horas. Após isso, permaneceram por um

minuto em solução de azul de metileno 1% (Labsynth, Diadema SP, Brasil), quando foram posicionadas sobre um fundo preto com cera utilidade, com a face lingual para cima, objetivando-se o maior paralelismo possível entre as cúspides e entre as raízes linguais e vestibulares para avaliação em lupa estereoscópica. A imagem captada pela lupa, em aumento de 25 X, foi digitalizada e os pontos de referência considerados para a mensuração da perda óssea alveolar lingual foram a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar no ponto médio das raízes mesial, mediana e distal do primeiro molar inferior direito (Figura 3d). Depois de tomadas as três medidas, a média foi utilizada para análise estatística. As avaliações foram realizadas utilizando-se o programa computacional ImageJ 1.43 u.

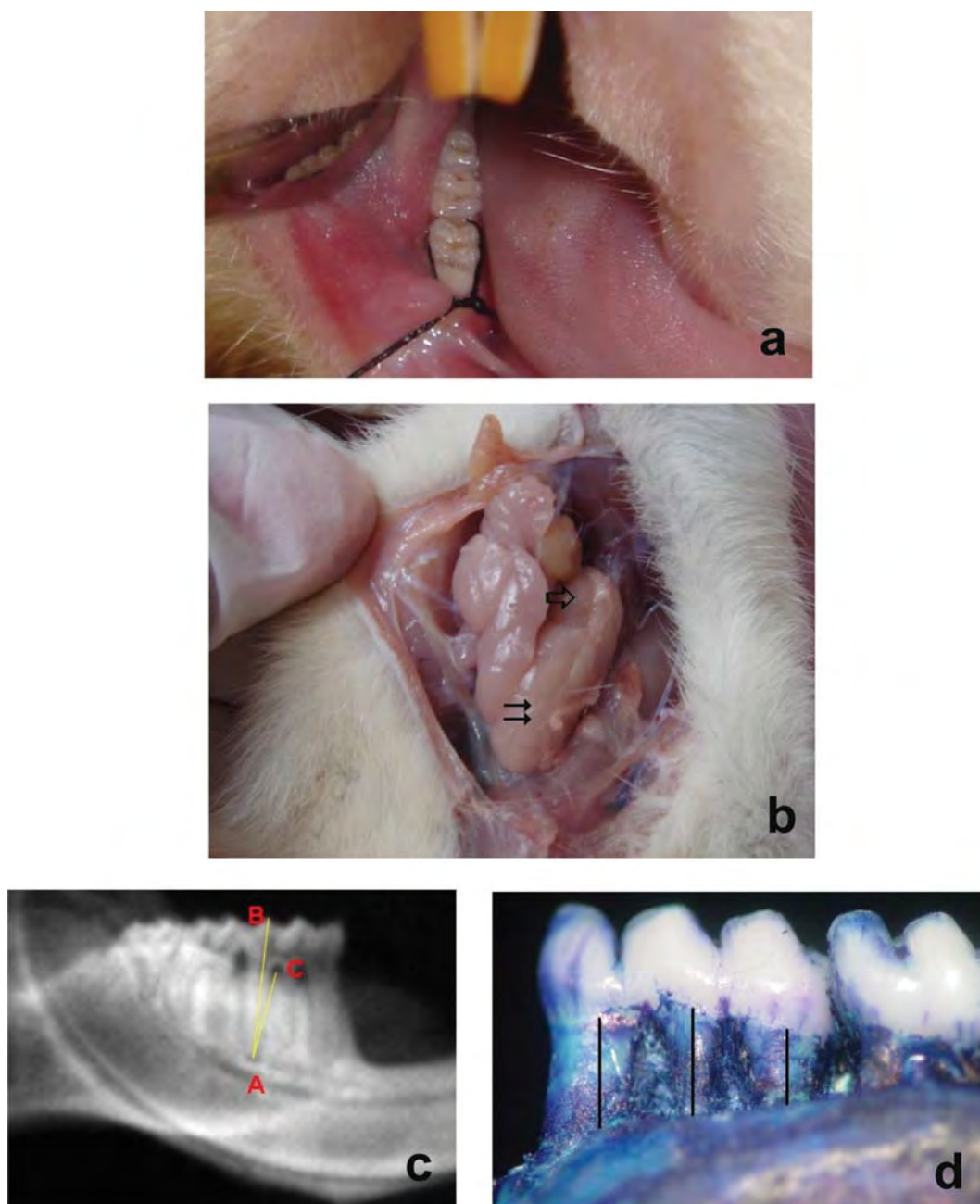


Figura 3- Metodologia do trabalho: a) Inserção da ligadura para indução da DP; b) Glândulas salivares sublingual (⇒) e submandibular (⇒); c) Radiografia marcada com os pontos A, B e C para mensuração do suporte ósseo pelo programa ImageJ; d) Aspecto macroscópico da perda óssea alveolar lingual em hemimandíbula direita mostrando a distância linear entre a junção esmalte-cimento e a crista óssea alveolar na região média raízes mesial, mediana e distal.

4.8 Análise histométrica das glândulas submandibular e sublingual

Depois de fixadas, as glândulas sofreram processamento como de rotina, e cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram corados com HE para avaliação histomorfométrica da porcentagem de área de ácinos e ductos e com *Alcian Blue* para avaliação da produção de mucina na sublingual.

Nas glândulas submandibulares, a porcentagem de área (A) das células acinares e ductos foi determinada com a utilização um retículo quadrangular de 80 pontos distribuídos sobre a imagem digitalizada em 400 x em 24 campos histológicos selecionados por amostragem sistemática para cada animal (Weibel et al., 1966), totalizando 1920 pontos contados por rato. O número de pontos sobre cada estrutura glandular que se quer quantificar (Pi) e sobre a glândula (P), contado com o auxílio do programa ImageJ foi anotado e a porcentagem de área de cada estrutura foi então calculada pela fórmula:

$$A = \frac{P_i \text{ (pontos sobre a estrutura que se quer quantificar)}}{P \text{ (pontos sobre a glândula)}}$$

Nas mesmas lâminas coradas com HE, foi avaliada a vacuolização da glândula submandibular em cinco campos no centro dos cortes histológicos, digitalizados em aumento de 400x. Foram contados os ácinos com células vacuoladas em cada imagem com o auxílio do programa ImageJ.

Nos animais dos grupos C-SL e C-CL, os ductos das glândulas sublinguais também foram avaliados histomorfometricamente, com a utilização de um retículo quadrangular de 391 pontos sobre a imagem digitalizada em 200 x em cinco campos histológicos selecionados

por amostragem sistemática (Weibel et al., 1966) para cada animal, totalizando 1955 pontos contados por rato. Utilizou-se a mesma fórmula de porcentagem de área (A) da análise histomorfométrica da glândula submandibular para cálculo da área ocupada pelos ductos na sublingual. Nestes mesmos animais, as lâminas coradas com *Alcian Blue* foram utilizadas para avaliação da produção de mucina na glândula sublingual.

Para mensurar a porcentagem de área de muco contida nos ácinos mucosos utilizaram-se dez imagens digitalizadas em 200x por grupo e o recurso de programação automática do Programa AxioVision (Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha). Neste *software* foi criada uma programação onde, ao selecionar manualmente uma área da glândula corada em azul, ocorria seleção automática de todas as áreas do campo com a mesma coloração e binarização da imagem. Finalmente o programa fornecia a porcentagem de área ocupada pela cor selecionada.

4.9 Delineamento experimental e análise estatística

Com o objetivo de se responder às proposições, os dados foram analisados em duas partes. Para a escolha do teste estatístico adequado, todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, aderência Lilliefors. Estabeleceu-se o nível de significância de 5% para todos os testes. Para realização das análises, foram utilizados os programas computacionais BIOSTAT *for Windows* 2.0 (Belém PA, Brasil) e GraphPad Prism Versão 5.00 Portable *for Windows* (GraphPad Software, San Diego CA, EUA).

4.9.1 Parte I: Influência da Doença Periodontal em glândula salivar

Para se avaliar a influência da DP nas glândulas submandibulares e sublinguais, foram comparados os grupos C-SL e C-CL. Comparando-se estes grupos, realizou-se um experimento fatorial do tipo 1 x 2, no qual se analisou uma variável independente: DP, apresentando duas categorias ou níveis: presença (CL) ou ausência (SL). As unidades experimentais (ratos) foram distribuídas aleatoriamente para as duas condições experimentais (Quadro 1), com dez réplicas cada, totalizando vinte dados.

Quadro 1- Condições experimentais analisadas na Parte I

Ligadura	Presença	Ausência
n	10	10
Simbologia (Grupo)	C-L	C-SL

n= número de amostras por grupo

Foram submetidas a teste estatístico as variáveis dependentes: peso corporal, suporte ósseo alveolar, perda óssea alveolar lingual, medidas das glândulas submandibulares, histomorfometria dos ácinos e ductos das glândulas submandibulares e sublinguais, e vacuolização dos ácinos submandibulares.

Os dados obtidos na Parte I foram submetidos ao teste T de Student, exceto comprimento da glândula e perda óssea alveolar lingual que foram analisados pelo teste Mann-Whitney.

4.9.2 Parte II: Efeito do tratamento com Propranolol ou Isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução da DP

Para avaliação dos efeitos do tratamento com propranolol ou isoproterenol em glândula submandibular de ratos e em osso alveolar, foram comparados apenas os grupos nos quais foi inserida ligadura. Desta maneira, efetuamos um experimento fatorial do tipo 1x3, no qual existe uma variável independente: medicamento, que apresenta três categorias ou níveis: propranolol (PRO), isoproterenol (ISO) ou solução fisiológica / controle (C-L). As unidades experimentais (ratos) foram distribuídos aleatoriamente para as três condições experimentais (Quadro 2), com dez réplicas cada, totalizado trinta ratos.

Quadro 2- Condições experimentais analisadas na Parte II

Medicamento	Propranolol	Isoproterenol	Solução Fisiológica
n	10	10	10
Simbologia (Grupo)	PRO	ISO	C-L

n= número de amostras por grupo

As variáveis dependentes, submetidas a teste estatístico, foram: peso corporal, suporte ósseo alveolar, perda óssea alveolar lingual, medidas das glândulas submandibulares, histomorfometria dos ácinos, ductos e vacuolização dos ácinos da glândula submandibular.

O teste estatístico utilizado a Parte II foi análise de variância – ANOVA, quando necessário, aplicou-se o teste T de comparação múltipla para os efeitos que resultaram significativos. Apenas os dados de espessura da glândula salivar, não normais, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados, conforme descrito em material e método, em duas partes.

5.1 Parte I: Influência da doença periodontal em glândula salivar

5.1.1 Peso Corporal

Os valores de porcentagem de ganho de peso foram submetidos à estatística descritiva, cujos resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Estatística descritiva referente aos dados de porcentagem de ganho de peso (Parte I)

Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
C-L	5,21	1,95	2,22	5,31	8,43
C-SL	4,97	1,74	2,47	5,19	8,70

C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura

Após o teste T de Student não foi verificada diferença estatística entre os grupos ($t = 0,291$; gl (graus de liberdade) = 17,76 (C-L) e 18 (C-SL); $p = 0,774$).

5.1.2 Suporte ósseo alveolar

Os dados de porcentagem de suporte ósseo foram submetidos à estatística descritiva (Figura 4) e ao teste T de Student, sendo que nos animais nos quais se induziu DP, observou-se menor suporte ósseo do que naqueles sem ligadura ($t = -2,767$; $gl = 13,16$ (C-L) e 18 (C-SL); $p = 0,016$).

5.1.3 Perda óssea alveolar lingual

Nos animais sem periodontite, o nível ósseo situava-se apicalmente à junção cimento-esmalte.

A Figura 5 resume a estatística descritiva dos valores de perda óssea. Após o teste de Mann-Whitney, observou-se que houve diferença estatística entre os dois grupos analisados ($U = 0,5$; $p = 0,0002$).

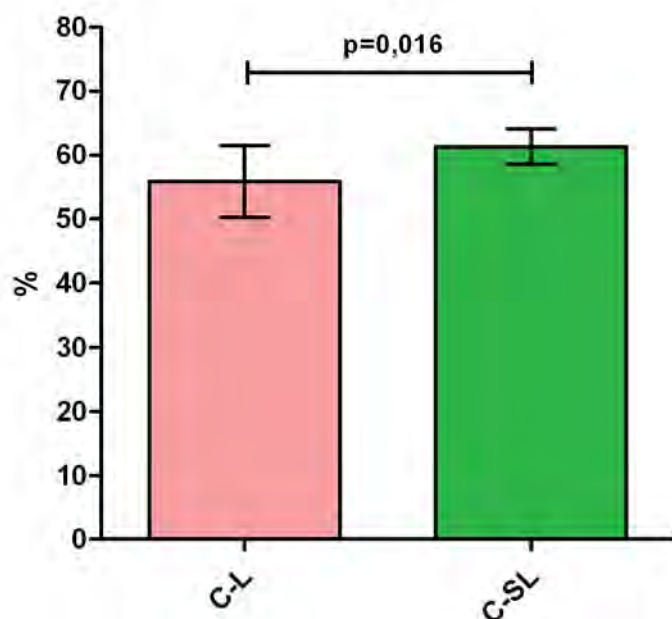


Figura 4 – Médias, desvios-padrão e estatística inferencial referentes aos valores percentagem de suporte ósseo mesial (Parte I). Teste T de Student. C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura.

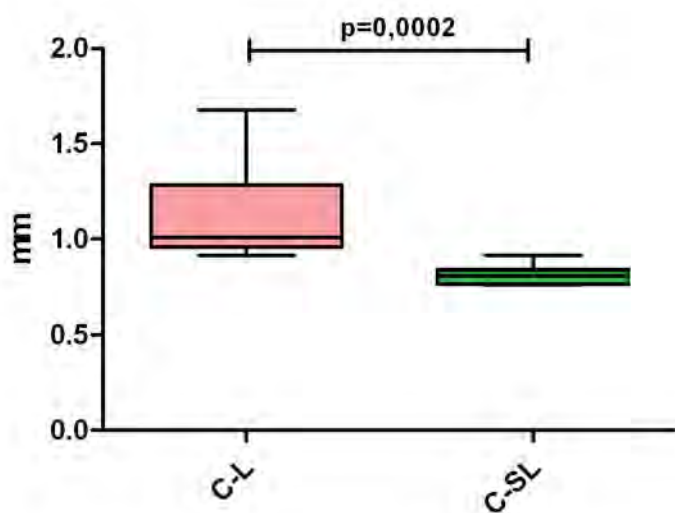


Figura 5 – Esquema dos cinco números (Boxplot) e estatística inferencial referentes aos valores de perda óssea alveolar lingual (Parte I). Teste estatístico de Mann-Whitney. C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura.

5.1.4 Medidas das glândulas salivares

A estatística descritiva dos dados pode ser observada na Tabela 2. O teste T de Student foi utilizado para a avaliação dos dados de peso ($t= 0,59$; $gl= 14,41$ (C-L) e 18 (C-SL); $p= 0,56$), largura ($t= 1,56$; $gl= 17,49$ (C-L) e 18 (C-SL); $p= 0,14$) e espessura ($t= 1,05$; $gl= 15,06$ (C-L) e 18 (C-SL); $p= 0,31$). Os dados de comprimento da glândula foram submetidos ao teste de Mann-Whitney ($U= 38$; $p= 0,36$).

Tabela 2 - Estatística descritiva referente às medidas das glândulas salivares (Parte I)

Variável	Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
Peso (g)	C-L	0,30	0,02	0,28	0,29	0,35
	C-SL	0,29	0,04	0,25	0,28	0,38
Comprimento (mm)	C-L	16,93	1,86	13,91	17,53	19,80
	C-SL	16,17	1,71	13,02	16,01	19,32
Largura (mm)	C-L	7,84	0,72	6,68	7,74	9,35
	C-SL	7,28	0,86	6,16	7,20	8,86
Espessura (mm)	C-L	3,61	0,62	2,71	3,43	4,74
	C-SL	3,36	0,39	2,76	3,34	3,96

C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura

5.1.5 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula submandibular

Os valores correspondentes a cada animal, submetidos à análise estatística, resultaram da média dos dados obtidos nas leituras dos 24 campos histológicos por animal. Devido a dificuldades técnicas, o número de espécimes utilizados nesta análise foi de nove animais (n=9). A estatística descritiva pode ser visualizada na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na análise dos ácinos ($t = -1,85$; $gl = 17$ (C-L e C-SL); $p = 0,08$) e ductos ($t = 1,94$; $gl = 15,93$ (C-L) e 17 (C-SL); $p = 0,07$).

Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados de porcentagem de área de ácinos e ductos em glândula submandibular (Parte I)

Variável	Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
Ácinos	C-L	65,47	3,48	60,31	65,7	70,57
	C-SL	68,28	3,13	63,14	67,14	72,97
Ductos	C-L	32,1	4,47	24,69	32,12	36,82
	C-SL	28,71	3,05	24,69	29,58	33,75

C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura

5.1.6 Vacuolização na glândula submandibular

Os dados de vacuolização foram submetidos à análise descritiva (Tabela 4) e ao teste T de Student ($t= 0,88$; $gl= 17,63$ (C-L) e 18 (C-SL); $p= 0,67$).

Tabela 4 - Estatística descritiva do número de ácinos com células vacuolizadas por campo histológico (400x) em glândula submandibular (Parte I)

Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
C-L	5,74	2,5	1,8	6,5	9,2
C-SL	4,81	2,16	2,4	4,5	9,75

C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura

5.1.7 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula sublingual

Os dados referentes à histomorfometria da glândula sublingual foram submetidos à estatística descritiva, como pode ser visto na Tabela 5. O teste T de Student foi utilizado para avaliação dos ductos ($t= -0,73$; $gl= 11,05$ (C-L) e 14 (C-SL); $p= 0,15$) e da área ocupada por muco nos ácinos ($t= 1,07$; $gl= 13,7$ (C-L) e 16 (C-SL); $p= 0,33$). Devido a dificuldades técnicas, durante a confecção das lâminas, utilizaram-se apenas oito animais nesta análise ($n= 8$). A glândula sublingual corada em *alcian blue* pode ser observada na Figura 6a.

Tabela 5 - Estatística descritiva dos dados de porcentagem de área ocupada por muco e ductos em glândula sublingual (Parte I)

Variável	Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
Área ocupada por muco	C-L	89,70	2,20	87,21	89,57	93,05
	C-SL	87,98	4,44	79,95	88,21	94,53
Ductos	C-L	7,48	1,14	9,16	7,19	9,16
	C-SL	7,82	0,64	8,59	7,88	8,59

C-L: grupo controle com ligadura; C-SL: grupo controle sem ligadura

5.1.8 Análise Descritiva em HE

Em ambos os grupos, a glândula submandibular era constituída por lóbulos delimitados por tecido conjuntivo fibroso, o qual exibia fibroblastos e vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. O parênquima glandular apresentou em sua maioria ácinos seromucosos e escassos mucosos, e ductos estriados, granulares, intercalares e excretores.

Os ácinos seromucosos encontravam-se bem definidos e arredondados. As células que compunham os ácinos possuíam formato piramidal, com núcleo esférico, localizado na porção basal. Vacúolos claros foram identificados em algumas células ácinares. Os ductos intercalares não foram frequentes na glândula, e os ductos estriados eram revestidos por células cilíndricas, com núcleos centralmente localizados e citoplasma intensamente corado pela eosina, o que os tornava facilmente reconhecível. Houve também grande quantidade de ductos granulares, com núcleos localizados apicalmente, e vários grânulos eosinofílicos, birrefringentes, preenchendo todo o citoplasma (Figura 6b e 6c).

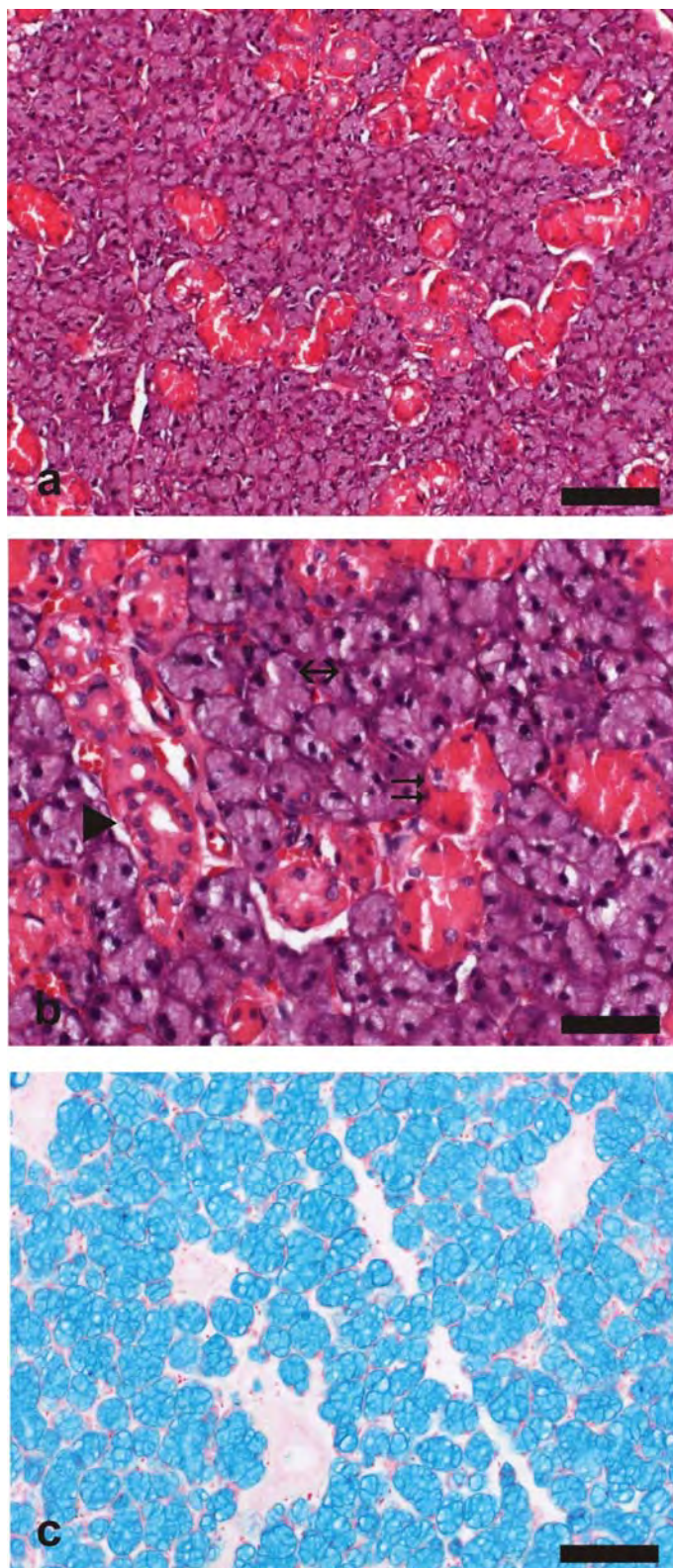


Figura 6 – Parênquima da glândula salivar. Glândula submandibular exibindo grande quantidade de células acinares ($\leftrightarrow$), ductos granulares ($\Rightarrow$) e estriados ($\blacktriangleright$). HE. a) Grupo C-SL: barra= 100 μ m. b) Grupo C-L: barra= 50 μ m. c) Glândula sublingual corada em *alcian blue*, barra= 50 μ m.

5.2 Parte II: Efeito do tratamento com Propranolol ou Isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução de Doença Periodontal

5.2.1 Peso Corporal

Os valores de porcentagem de ganho ou perda de peso nas condições experimentais analisadas na Parte II foram submetidos à análise descritiva e inferencial, cujos resultados podem ser observados na Tabela 6. Verificou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos (ANOVA $F(2,27) = 39,93$; $p = 0$).

Tabela 6 - Estatística descritiva e inferencial referente aos dados de porcentagem de ganho ou perda de peso (Parte II)

Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo	Grupos homogêneos
C-L	5,21	1,95	2,22	5,31	8,43	A
PRO	2,21	3,10	-1,09	1,27	7,14	B
ISO	-4,63	2,40	-8,54	-4,65	0,00	C

Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$). C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol

5.2.2 Suporte ósseo alveolar

Os dados de porcentagem de suporte ósseo alveolar das condições experimentais avaliadas na Parte II foram submetidos à estatística descritiva e os resultados podem ser observados na Figura 7.

Os tratamentos com Propranolol e Isoproterenol não causaram diferença estatística no suporte ósseo alveolar em relação aos animais controle (ANOVA, $F(2,27) = 2,35$; $p = 0,113$).

5.2.3 Perda óssea alveolar lingual

A estatística descritiva dos valores de perda óssea se resume na Figura 8. A administração de Isoproterenol levou a maior perda óssea alveolar lingual ($kw = 19,42$; $gl = 2$; $p = 0,0001$).

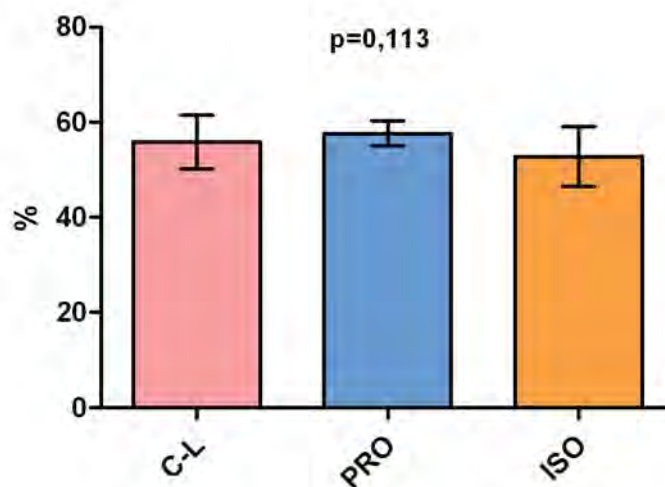


Figura 7 – Médias, desvios-padrão e estatística inferencial referentes aos valores de porcentagem de suporte ósseo alveolar (Parte II). Teste estatístico ANOVA. C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol.

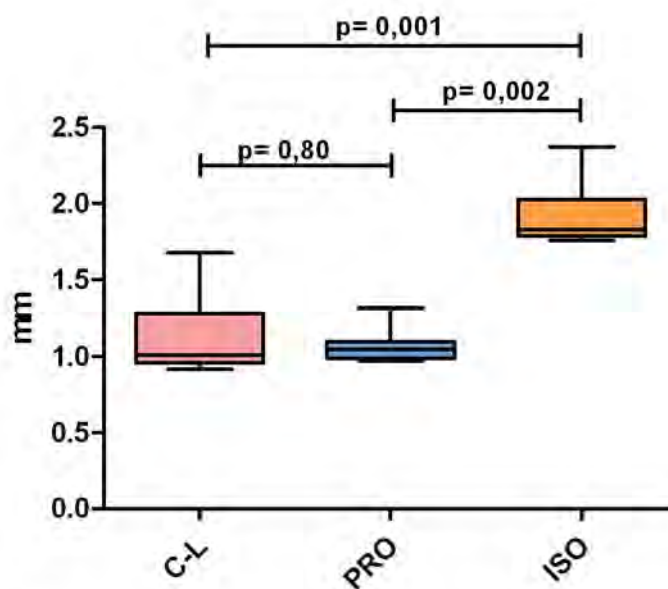


Figura 8 - Esquema dos cinco números (Boxplot) e estatística inferencial referentes aos valores perda óssea alveolar lingual (Parte II). Teste estatístico de Kruskal-Wallis. C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol.

5.2.4 Medidas das glândulas salivares

A estatística descritiva e inferencial dos dados apresenta-se na Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) foi o teste utilizado para avaliação dos dados de peso ($F(2,27) = 26,36$; $p = 0$), largura ($F(2,27) = 6,05$; $p = 0,01$) e comprimento ($F(2,27) = 4,68$; $p = 0,02$). Os dados de espessura da glândula foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($kw = 14,17$; $gl = 2$; $p = 0,0008$).

Tabela 7 - Estatística descritiva e inferencial referentes aos dados medidas das glândulas salivares (Parte II)

	Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo	Grupos homogêneos
peso	C-L	0,30	0,02	0,28	0,29	0,35	A
	PRO	0,31	0,02	0,28	0,30	0,34	A
	ISO	0,56	0,16	0,34	0,60	0,60	B
comprimento	C-L	16,93	1,86	13,91	17,53	19,80	A
	PRO	16,78	1,58	14,36	16,78	19,21	A
	ISO	18,25	1,65	16,72	18,25	21,71	B
largura	C-L	7,83	0,72	6,68	7,74	9,35	A
	PRO	7,19	0,87	5,88	7,01	8,75	A
	ISO	8,84	1,19	7,06	9,12	10,33	B
espessura	C-L	3,61	0,62	2,71	3,43	4,74	A
	PRO	3,77	0,45	3,18	3,69	4,87	A
	ISO	5,02	0,87	3,66	4,97	6,96	B

Considerando-se cada variável, letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$). C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol. Peso em gramas e demais valores em milímetros.

Observando-se a Tabela 7, verifica-se que foi encontrada diferença estatística significativa com relação ao grupo que recebeu tratamento com Isoproterenol, com valor maior do que os animais do Grupo Controle ou que receberam tratamento com Propranolol.

5.2.5 Histomorfometria dos ácinos e ductos da glândula submandibular

ANOVA foi o teste usado para avaliar a porcentagem de área ocupada por ácinos ($F(2,27)= 137,85$; $p= 0$) e ductos. ($F(2,27)= 105,85$; $p= 0$). Os dados da estatística descritiva e inferencial podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Estatística descritiva e inferencial referentes aos dados de porcentagem de área de ácinos e ductos em glândula submandibular (Parte II)

	Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo	Grupos homogêneos
ácinos	C-L	65,47	3,48	60,31	65,70	0,70	A
	PRO	66,43	1,81	63,80	66,67	0,69	A
	ISO	86,09	3,76	78,07	86,98	0,91	B
ductos	C-L	32,09	4,47	24,69	32,13	36,82	A
	PRO	31,27	1,61	29,01	30,91	34,27	A
	ISO	11,45	4,02	5,63	10,65	19,64	B

Considerando-se cada variável, letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p<0,05$). C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol

5.2.6 Vacuolização na glândula submandibular

Após obtenção da média dos resultados por animal, os dados foram submetidos a ANOVA ($F(2,27) = 23,19$; $p = 0$). Na Tabela 9 observam-se os dados da estatística descritiva e inferencial.

Tabela 9 - Estatística descritiva do número de ácidos com células vacuolizadas por campo histológico (400 x) em glândula submandibular (Parte II)

Grupo	Média	Desvio-Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo	Grupos homogêneos
C-L	5,74	2,50	1,8	6,5	9,2	A
PRO	3,7	1,65	0,8	3,4	5,4	B
ISO	0,48	0,34	0	0,4	1	C

Letras diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p < 0,05$). C-L: grupo controle com ligadura, PRO: grupo propranolol, ISO: grupo isoproterenol

5.2.7 Análise Descritiva em HE

Morfolologicamente, não foi notada diferença entre os grupos PRO e C-L, como descrito na Parte I do trabalho (Figura 6).

A vacuolização foi medida histomorfometricamente (análise quantitativa) e houve diferença estatística entre os grupos PRO e C-L, porém morfolologicamente, tal diferença não foi evidente. Ao comparar com o grupo ISO com os demais foi clara a diminuição de vacúolos.

No grupo ISO, os ácidos mostraram-se distintos dos outros grupos, bem definidos e com células acinares hipertrofiadas com

citoplasma homogêneo e sem granulação. Nos campos analisados foi evidente a redução da presença dos ductos granulares (Figura 9).

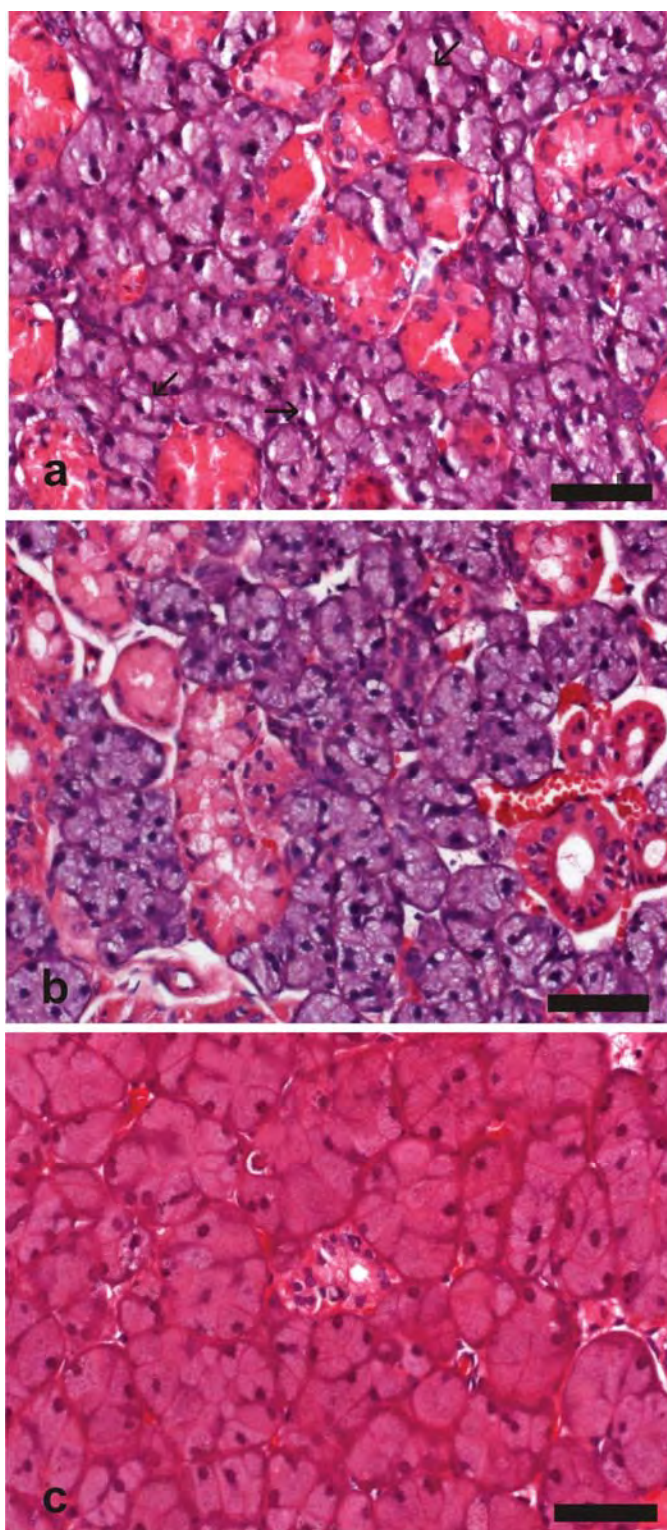


Figura 9 – Aspecto da glândula submandibular nos diferentes grupos: a) Grupo C-L e b) Grupo PRO: Ácinos e ductos com aspecto de normalidade e notável presença de vacúolos (g). c) Grupo ISO: Células acinares hipertrofiadas com citoplasma mais homogêneo do que nos demais grupos. HE, barra= 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

Da mesma maneira que os resultados, a discussão será apresentada em duas partes, de acordo com os objetivos propostos.

6.1 Parte I - Influência da Doença Periodontal em glândula salivar

Os seres vivos apresentam interações sistêmicas muitas vezes ainda não compreendidas. O entendimento da influência da DP nas glândulas salivares constitui importante subsídio para a compreensão de seus efeitos no organismo.

Vários estudos têm sido realizados para a avaliação de DP induzida em ratos, com utilização de fio de algodão (Barros et al., 2003; Ekuni et al., 2010) ou fio de seda (Breivik et al., 2005; Rodini et al., 2008) ao redor dos molares. Nesses trabalhos, os períodos para indução de ligadura variam de um a sessenta dias. De acordo com Rodini (2005), na DP induzida, verificam-se áreas de reabsorção óssea alveolar desde as primeiras 24 horas após inserção da ligadura, sendo observado que a partir do quadragésimo segundo dia há uma estagnação da perda óssea alveolar. O pico de reabsorção óssea no modelo de DP induzida por ligadura ocorre aos 15 dias (Kuhr et al., 2004; Rodini, 2005). Na presente pesquisa, o período e a metodologia utilizados foram suficientes para a indução de DP, uma vez que se verificou diferença significativa entre os animais com e sem ligadura em todas as análises realizadas.

A inserção de ligadura para produção de DP não influenciou significativamente o peso dos animais, resultado esperado e

de acordo com a literatura consultada (Okada et al., 2010), evidenciando que a indução da periodontite provavelmente não alterou a ingestão de alimentos dos animais.

Poucos estudos foram encontrados sobre a influência da DP em glândula submandibular (Busch et al., 2008; 2009; Ekuni et al., 2010; Amer et al., 2011) e parótida (Miozza et al., 2009), em ratos. Não encontramos na revisão de literatura nenhum trabalho relacionando DP com a glândula sublingual.

Ekuni et al. (2010) ao compararem ratos com e sem DP induzida por ligadura, observaram maior vacuolização na glândula submandibular dos animais com DP, após 2 ou 4 semanas de indução. Segundo o autor, o desequilíbrio na circulação sanguínea dos estados oxidativo/anti-oxidativo gerados pela inflamação na periodontite pode estar envolvido nas alterações encontradas nas glândulas submandibulares: vacuolização e apoptose. Na presente pesquisa, também avaliamos a quantidade de vacúolos das glândulas submandibulares e não encontramos diferenças relevantes entre os grupos. Enquanto Ekuni et al. (2010) avaliaram a vacuolização por meio de escores (semi-quantitativa), nós fizemos uma análise quantitativa, geralmente mais precisa. Encontramos vacúolos na submandibular independentemente da indução da DP. Segundo Garrett (1987), células vacuoladas estão presentes em praticamente todas as glândulas parótidas de rato, embora tais características sejam normalmente ignoradas pela literatura. Vários componentes celulares podem estar presentes nos vacúolos, e uma passagem direta de material pode ocorrer para seu interior pelas cisternas do retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi. Os vacúolos, por sua vez, podem comunicar-se com o interstício ou com o lúmen acinar (Garrett, 1987). O mesmo autor associa também tais vacúolos à dieta de ração rígida e ao frio.

Busch et al. (2008) também avaliaram os efeitos da DP induzida por ligadura, durante 22 dias, em extratos de glândula

submandibular, e verificaram que nos animais com doença, a secreção de mucina era aumentada, provavelmente pela estimulação que os mediadores inflamatórios da DP exercem no sistema nervoso simpático. Os autores encontraram uma redução na população de β -receptores glandulares nos animais com DP, como o que acontece quando um receptor é continuamente estimulado. Em nosso trabalho, utilizamos a coloração de *Alcian Blue* para avaliar a quantidade de mucina em glândula sublingual, e não encontramos diferença entre os grupos, diferentemente do encontrado por Bush et al. em extratos de glândula submandibular. Devido à predominância de ácinos seromucosos na glândula submandibular, não utilizamos a coloração de *Alcian Blue* para sua análise. O fato de não termos encontrado alteração na produção de mucina na sublingual pode ser explicado pela reduzida inervação simpática nesta glândula (Proctor, Carpenter, 2007).

Não encontramos diferença significativa nas glândulas salivares entre os grupos com e sem DP, concluindo que dentro dos parâmetros avaliados (porcentagem de área de ácinos e ductos em submandibular e porcentagem de área de muco e de ductos em sublingual), a DP não causou efeitos sistêmicos que influenciassem as glândulas. Outros estudos (Busch et al., 2009; Miozza et al., 2009; Amer et al., 2011) têm verificado presença de mediadores inflamatórios (PGE2, leucotrienos, NO) em glândula salivar de ratos com periodontite, na ausência de inflamação glandular. De uma maneira geral, tais autores acreditam que as alterações glandulares induzidas pela DP são associadas ao sistema nervoso simpático, o que justifica a hipótese de que o SNS pode modular a DP, tanto pela sua ação no tecido ósseo (estudada na Parte II desta dissertação), como na produção salivar, com possível efeito protetor na doença.

6.2 Parte II - Influência Efeito do tratamento com Propranolol ou Isoproterenol em glândula submandibular e em osso alveolar durante a indução da Doença Periodontal

No presente trabalho, utilizamos ratos como modelo experimental, e para fins de comparação, a dose de medicamentos utilizada em camundongos corresponde aproximadamente ao dobro da dose para ratos, de acordo com o preconizado por Regan-Shaw et al. (2008). Por exemplo, a dose que utilizamos na pesquisa do isoproterenol foi de 0,75 mg/kg, em camundongos essa dose seria de 1,5 mg/kg.

A realização de um projeto piloto neste trabalho foi imprescindível, pois houve grande dificuldade em padronizar a dose de isoproterenol. A dose proposta inicialmente de 2 mg/kg/dia foi baseada no estudo de Takeda et al. (2002), que administraram isoproterenol a camundongos, e convertida para uso em ratos de acordo com o preconizado por Reagan-Shaw et al. (2008). No entanto, no estudo piloto esta dose de isoproterenol induziu uma alta taxa de mortalidade dos ratos. Diminuiu-se então a dose até chegar à utilizada neste estudo (0,75 mg/kg/dia), onde houve um nível de mortalidade reduzido com as alterações esperadas (aumento de volume) nas glândulas salivares. Alta taxa de mortalidade também foi encontrada no trabalho de Issy et al. (2009), quando a dose de 10 mg/kg/dia de *isoproterenol ((+)-bitartrate salt* (Sigma, St. Louis MO, EUA)) foi utilizada. Dada a alta mortalidade induzida pela dose de 10mg/Kg, os autores trataram os ratos com 2 ou 5 mg/kg de isoproterenol, por 8 dias. Vários trabalhos usaram doses maiores (Onofre et al., 1997; Ochiai et al., 2002; Kondo, Togari, 2011), e não relataram perda de animais, sendo que a linhagem dos animais pode de alguma forma influenciar a resposta dos animais ao medicamento. O isoproterenol apresenta efeitos importantes no sistema cardiovascular, aumentando o débito cardíaco, mas diminuindo a resistência periférica

(Katzung, 2010). Além disso, o medicamento pode induzir a severa arritmia, levando a fibrilação ventricular e morte. Devido a tais efeitos negativos, este medicamento atualmente é apenas utilizado em emergências cardíacas, em ambiente hospitalar.

Em comparação com o grupo controle, o tratamento com propranolol causou menor ganho de peso, já o tratamento com isoproterenol resultou em perda de peso. A maioria dos trabalhos que analisaram a ação do propranolol sobre peso também relatou ganho de peso (Hayes et al., 1984; Rössner et al., 1990). Penha (2006) administrou propranolol em água de beber (0,5 g/l) por um período de oito semanas e o peso corporal médio dos ratos tratados foi significativamente menor que o peso médio do grupo controle, assim como aconteceu no presente trabalho. Por outro lado, Pauletto et al. (1985) trataram ratos durante oito semanas com 10mg/kg de propranolol e não encontraram alteração significativa no peso corporal. Da mesma forma, Schmitz et al. (2007) administraram propranolol (0,5 mg/kg) em camundongos, por via subcutânea e não encontraram diferenças significativas no peso corporal.

O tratamento com isoproterenol causou diminuição de peso dos animais. A redução de peso do grupo ISO pode ser explicada pela ativação do receptor adrenérgico β_3 , responsável pelo mecanismo de lipólise (Rang et al., 2007). Páth et al. (2001) e Morisset et al. (2008) estudaram *in vitro* a produção da Interleucina-6 (IL-6) por adipócitos, e observaram uma maior concentração da IL-6 associada à lipólise induzida por isoproterenol. Por outro lado, Kondo e Togari (2011), não observaram alteração no peso corporal de camundongos durante administração de isoproterenol em todas as doses testadas (5, 25, 50 e 100 mg/kg/dia).

Com relação à influência do tratamento adrenérgico no osso alveolar, obtivemos resultados diferentes de Okada et al. (2010) que também estudaram a influência do propranolol na DP, na dose de 1 mg/kg/dia por 22 dias, verificando redução da perda óssea na DP com o β -bloqueador. De acordo com a nossa metodologia, não houve diferença

significante na DP com a administração do medicamento. Tal diferença pode ser devida à dose que utilizamos (0,1 mg/kg/dia), que foi baseada em estudos anteriores que estabeleceram a dose suficiente para reduzir reabsorção óssea em fêmur, tíbia e vértebras de ratos após dez semanas de tratamento (Minkowitz et al., 1991; Bonnet et al., 2006; 2008), sem afetar a pressão arterial (Sato et al., 2010). Como nos estudos de Bonnet et al. (2006) e Sato et al. (2010), a dose de 0,1 mg/kg levou a melhores resultados que doses maiores, fizemos nossa opção. O período de administração do medicamento pode ter sido um fator relevante para não influência do propranolol na DP, pois administramos o medicamento por 14 dias, já que o pico da DP em ratos induzida por ligadura ocorre nos primeiros 15 dias (Kuhr et al., 2004; Rodini, 2005). Inicialmente, propusemos um período experimental de dez semanas (Bonnet et al., 2006; 2008), mas em estudo piloto verificamos que os animais tratados com isoproterenol não sobreviviam ao tratamento durante tanto tempo. Para estipular o tempo de administração, baseamo-nos em Minkowitz et al. (1991), que utilizaram a dose de 0,05 mg de propranolol em ratos por 19 dias e tal esquema terapêutico foi suficiente para a melhoria da qualidade óssea. Em nosso trabalho, na avaliação da severidade da DP não foi utilizada a análise histológica, considerada como padrão-ouro, mas sim análises radiográficas e macroscópicas. Fernandes et al. (2007) compararam as análises histométrica e macroscópica para avaliação da perda óssea alveolar na DP induzida por ligadura e não encontraram diferença entre os dois métodos.

Apesar do propranolol não ter influenciado a DP em nosso trabalho, o mesmo não aconteceu com o isoproterenol, confirmando a ação do sistema nervoso durante a patogênese da DP. Foi a primeira vez que se analisou o envolvimento de um simpaticomimético na DP. Os mecanismos de interação RANK – RANKL são bastante conhecidos. A ligação do ativador do receptor para fator nuclear κ B (RANK) e seu ligante (RANKL), expresso em as superfícies dos osteoclastos e osteoblastos,

respectivamente, é essencial para induzir os osteoclastos maduros (Okada et al., 2010). Receptores adrenérgicos também são expressos nos osteoblastos (Rang et al., 2007). A ativação de receptores β -adrenérgicos, no presente estudo, através do isoproterenol, pode ter levado ao aumento da expressão de RANKL, o que induziu a formação de osteoclastos, contribuindo para o equilíbrio mineral ósseo negativo. Para confirmação desta hipótese, estudos imunoistoquímicos serão realizados no futuro pelo nosso grupo de pesquisa.

Outros autores também verificaram a ação do de agonistas adrenérgicos na redução da qualidade óssea e ação osteoclástica (Kondo, Togari, 2011). Alguns autores mostraram efeitos negativos na massa óssea e na microarquitetura trabecular em ratos causados pelo clenbuterol, um agonista beta-2 adrenérgico (Bonnet et al., 2005a; 2005b), enquanto outros autores (Zeman et al., 1991) evidenciaram que o mesmo medicamento preveniu a perda óssea causada pela denervação ciática em ratos.

Issy et al. (2009) e Lamy et al. (2010) demonstraram que o isoproterenol não influencia a glândula sublingual, e de acordo com Garrett et al. (1991), a glândula sublingual do rato tem carência de inervação simpática, com inervação apenas em ductos estriados e vasos sanguíneos. Esse foi o motivo pelo qual não realizamos as análises dos medicamentos na glândula sublingual.

A influência dos tratamentos isoproterenol e propranolol em submandibular também foi avaliada. De acordo com a metodologia utilizada, não observamos alterações histológicas de ácinos e ductos nas glândulas do grupo tratado com propranolol comparadas com o grupo controle. Já está bem estabelecido na literatura que a administração diária do β -simpaticomimético sintético isoproterenol, para ratos, causa grande aumento da massa fresca das glândulas parótida e submandibular (Onofre et al., 1997; Ochiai et al., 2002; Issy et al., 2009; Kondo, Togari, 2011), resultado também neste trabalho. Ochiai et al. (2002) ainda

observaram que quando há interrupção do tratamento com isoproterenol, o volume glandular volta aos padrões de normalidade.

Levando em consideração que quando a administração do isoproterenol é cessada a glândula volta aos padrões de normalidade, o aumento das glândulas pode ser causado por hipertrofia ou hiperplasia, alterações celulares reversíveis. Onofre et al. (1997) observaram após análise histomorfométrica, que houve aumento volume sem aumento do número de células acinares. A hipertrofia das células acinares ficou bem evidente em nosso trabalho, e explica o aumento do volume da glândula. Em análise com microscopia eletrônica, D'Amico e Skarmoutsou (2007) avaliaram a glândula parótida de ratos após administração de isoproterenol por dez dias. Observou-se uma redução numérica do retículo endoplasmático rugoso e maior volume do aparelho de Golgi em comparação ao grupo controle. A média do diâmetro dos grânulos foi aumentada, e sua densidade de volume quase duplicou. Os autores sugerem que o aumento glandular pode refletir, pelo menos parcialmente, o aumento do tamanho e do número de grânulos de secreção das células acinares. É sabido também que o tratamento crônico com isoproterenol causa alterações na expressão de proteínas secretórias (Muenzer et al., 1979), o que poderia resultar no aumento das células, já que o aparelho de Golgi e grânulos estão relacionados com o metabolismo e secreção das proteínas, respectivamente.

Nos animais tratados com isoproterenol, as células acinares apresentavam citoplasma homogêneo, praticamente sem vacuolização. A estimulação dos receptores β leva à exocitose dos grânulos sem formação de vacúolos (Garrett, 1987).

Ao contrário da porcentagem acinar, houve redução na área ocupada por ductos após o tratamento com isoproterenol. Lamy et al. (2010) após avaliação qualitativa, verificaram redução considerável da quantidade de ductos granulares após tratamento 50 mg/Kg de isoproterenol por dez dias em camundongos. Andrade et al. (1994) após 3

dias de tratamento com 40 mg/kg de isoproterenol, verificaram uma queda de 48,4% na fração de volume glandular ocupada pelos ductos granulosos na submandibular de ratos. No entanto, em períodos maiores, as células dos ductos granulosos não apresentaram efeito sialoadenotrófico frente ao isoproterenol. Outros pesquisadores sugerem que os ductos granulosos, ao serem comprimidos pelos ácinos hipertrofiados perdem os seus grânulos e atrofiam-se (Andrade et al., 1994).

O presente estudo inclui-se na literatura que relaciona os tratamentos adrenérgicos ao tecido ósseo e glândula salivar, sendo que novos estudos utilizando técnicas de biologia molecular e imunoistoquímica poderão indicar com mais precisão os mecanismos envolvidos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada, conclui-se que:

- a) A DP não influenciou de maneira significativa as características histológicas da glândula submandibular e sublingual;
- b) A estimulação simpática agravou a DP;
- c) O bloqueio β -adrenérgico não causou alteração na DP;
- d) A associação entre DP e os tratamento com isoproterenol levou às alterações glandulares mais significativas, como hipertrofia acinar e redução da área ocupada por ductos.

8 REFERÊNCIAS*

Amer M, Elverdin JC, Fernández-Solari J, Medina VA, Chiarenza AP, Vacas MI. Reduced methacholine-induced submandibular salivary secretion in rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011 May;56(5):421-7.

Andrade L, Onofre M, Taga R. Estudo morfométrico do crescimento de glândulas submandibulares de ratos tratados com isoproterenol. II. Modificações no compartimento dos ductos granulosos. *Rev Fac Odont Bauru.* 1994;2(4):6.

Barros S, Silva M, Somerman M, Nociti FJ. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res.* 2003 Oct;82(10):791-5.

Beal A. Blockade of isoprenaline-induced fluid and protein secretion by the mandibular glands of the red kangaroo, *Macropus rufus*, with selective antagonists. *Arch Oral Biol.* 2000 Aug;45(8):701-6.

Bonnet N, Benhamou C, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada M, Richard O, et al. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone.* 2005a Nov;37(5):622-33.

Bonnet N, Benhamou C, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008 Dec;217(3):819-27.

* 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

Bonnet N, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada M, Collomp K, Benhamou C, et al. Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Med Sci Sports Exerc.* 2005b Sep;37(9):1493-501.

Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, et al. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone.* 2007 May;40(5):1209-16.

Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou C, Courteix D. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Sep;318(3):1118-27.

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

Breivik T, Gundersen Y, Opstad P, Fonnum F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. *J Periodontal Res.* 2005 Aug;40(4):325-30.

Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. Beta-adrenoceptor alterations coupled with secretory response and experimental periodontitis in rat submandibular glands. *Arch Oral Biol.* 2008 Jun;53(6):509-16.

Busch L, Miozza V, Sterin-Borda L, Borda E. Increased leukotriene concentration in submandibular glands from rats with experimental periodontitis. *Inflamm Res.* 2009 Abr; 58:423–30.

Chenu C. Role of innervation in the control of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004 Jun;4(2):132-4.

D'Amico F, Skarmoutsou E. Immunolocalization of E-cadherin and alphaE-catenin in rat parotid acinar cell under chronic stimulation of isoproterenol. *Arch Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):161-7.

Ekuni D, Endo Y, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Tomofuji T, et al. Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. *Arch Oral Biol.* 2010 Feb;55(2):170-6.

Elefteriou F, Ahn J, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005 Mar;434(7032):514-20.

Fernandes M, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados P, Rosing C. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rat. *Braz Oral Res.* 2007;21(3):6.

Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res.* 1987 Feb;66(2):387-97.

Garrett JR, Suleiman AM, Anderson LC, Proctor GB. Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell Tissue Res.* 1991 Apr;264(1):117-26.

Goodman L, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2007.

Hamrick M, Ferrari S. Leptin and the sympathetic connection of fat to bone. *Osteoporos Int.* 2008 Jul;19(7):905-12.

Hayes PC, Stewart WW, Bouchier IA. Influence of propranolol on weight and salt and water homoeostasis in chronic liver disease. *Lancet.* 1984 Nov;2(8411):1064-8.

Hirotsu T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H. A preliminary study on the relationship between stimulated saliva and periodontal conditions in community-dwelling elderly people. *J Dent.* 2006 Oct;34(9):692-8.

Hiroto T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H. Salivary spinability and periodontal disease progression in an elderly population. Arch Oral Biol. 2008 Nov;53(11):1071-6.

Issy AC, da Silva CA, Guimarães FS, Del Bel EA. Different role of isoproterenol and NOS inhibitors on salivary ducts of rats. Micron. 2009 Apr;40(3):343-9.

Karsenty G, Ducy P. The hypothalamic control of bone mass, implication for the treatment of osteoporosis. Ann Endocrinol (Paris). 2006 Apr;67(2):123.

Kim Y, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Onozuka M, et al. Cervical sympathectomy causes alveolar bone loss in an experimental rat model. J Periodontal Res. 2009 Dec;44(6):695-703.

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

Kondo A, Togari A. In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003 Sep;285(3):E661-7.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2004 Apr;39(2):101-6.

Lamy E, Baptista E, Coelho A, Capela e Silva F. Morphological alterations in salivary glands of mice (*Mus musculus*) submitted to tannin enriched diets: comparison with sialotrophic effects of sympathetic agonists stimulation. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010;62(4):8.

Levasseur R, Dargent-Molina P, Sabatier J, Marcelli C, Bréart G. Beta-blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the Epidemiologie de l'Osteoporose prospective study. J Am Geriatr Soc. 2005 Mar;53(3):550-2.

Marenzana M, De Souza R, Chenu C. Blockade of beta-adrenergic signaling does not influence the bone mechano-adaptive response in mice. *Bone*. 2007 Aug;41(2):206-15.

Meisinger C, Heier M, Lang O, Döring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Osteoporos Int*. 2007 Sep;18(9):1189-95.

Minkowitz B, Boskey A, Lane J, Pearlman H, Vigorita V. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J Orthop Res*. 1991 Nov;9(6):869-75.

Miozza V, Borda E, Sterin-Borda L, Busch L. Experimental periodontitis induces a cAMP-dependent increase in amylase activity in parotid glands from male rats. *Inflammation*. 2009 Dec;32(6):357-63.

Morisset AS, Huot C, Légaré D, Tchernof A. Circulating IL-6 concentrations and abdominal adipocyte isoproterenol-stimulated lipolysis in women. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jul;16(7):1487-92.

Muenzer J, Bildstein C, Gleason M, Carlson DM. Properties of proline-rich proteins from parotid glands of isoproterenol-treated rats. *J Biol Chem*. 1979 Jul;254(13):5629-34.

Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res*. 2006 Dec;41(6):527-34.

Nascimento Pinto C, Cestari T, R T. Apoptose e proliferação celular durante o crescimento da glândula parótida do rato induzido pelo isoproterenol. 14 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. 2006.

Ochiai S, Hashimoto S, Shimono M. Acinar cell hypertrophy, proliferation and cell death in rat submandibular glands induced by long-term isoproterenol administration. *Acta Histochem Cytochem*. 2002;35(5):11.

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

Onofre M, de Souza L, Campos AJ, Taga R. Stereological study of acinar growth in the rat parotid gland induced by isoproterenol. *Arch Oral Biol*. 1997 May;42(5):333-8.

Oringer R. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*. 2002 Apr;73(4):460-70.

Pauletto P, Dalla Libera L, Vescovo G, Scannapieco G, Angelini A, Pessina AC, et al. Propranolol-induced changes in ventricular isomyosin composition in the rat. *Am Heart J*. 1985 Jun;109(6):1269-73.

Penha D. Estudo histomorfométrico em ossos de ratas jovens submetidas à atividade física de alto impacto e administração de propranolol [tese]. Uberaba: Universidade Federal do triângulo mineiro; 2006.

Pierroz D, Bouxsein M, Rizzoli R, Ferrari S. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone*. 2006 Aug;39(2):260-7.

Pierroz DD BM, Muzzin P, Rizzoli R, Ferrari SL. Bone loss following ovariectomy is maintained in absence of adrenergic receptor β_1 and β_2 signaling. *J Bone Miner Res*. 2005;. 20(Suppl.1)S277.

Proctor G, Carpenter G. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci*. 2007 Apr;133(1):3-18.

Päth G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):2281-8.

Rang H, Dale M, Ritter J. Farmacologia. 6ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

Reagan-Shaw M, Nihal, et al. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J. 2008 22(3):659-61.

Reid I. Effects of beta-blockers on fracture risk. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008 Apr-Jun;8(2):105-10.

Reid I, Gamble G, Grey A, Black D, Ensrud K, Browner W, et al. beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. J Bone Miner Res. 2005a Apr;20(4):613-8.

Reid I, Lucas J, Wattie D, Horne A, Bolland M, Gamble G, et al. Effects of a beta-blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab. 2005b Sep;90(9):5212-6.

Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen B, Kolthoff N, Brixen K, et al. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. Calcif Tissue Int. 2004 Nov;75(5):365-72.

Rodini CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9 [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2005.

Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. J Mol Histol. 2008 Jun;39(3):275-82.

Rössner S, Taylor CL, Byington RP, Furberg CD. Long term propranolol treatment and changes in body weight after myocardial infarction. BMJ. 1990 Apr;300(6729):902-3.

Salvi G, Lang N. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32 (Suppl 6):108-29.

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Jul;334(1):99-105.

Schlienger R, Kraenzlin M, Jick S, Meier C. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*. 2004 Sep;292(11):1326-32.

Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R. beta-Adrenergic blockade during systemic inflammation: impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. *Resuscitation*. 2007 Feb;72(2):286-94.

Serre C, Farlay D, Delmas P, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999 Dec;25(6):623-9.

Seymour G, Ford P, Cullinan M, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Oct;13 Suppl 4:3-10.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker K, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002 Nov;111(3):305-17.

The American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. 4.ed. Chicago: 2001.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger J. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.

Weibel E, Kistler G, Scherle W. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966 Jul;30(1):23-38.

Wiens M, Etminan M, Gill S, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med*. 2006 Oct;260(4):350-62.

Wucherpfennig A, Chiego DJ, Avery J. Tritiated thymidine autoradiographic study on the influence of sensory and sympathetic innervation on periodontal wound healing in the rat. *Arch Oral Biol*. 1990;35(6):443-8.

Yagiela J, Neidle E, Dowd J. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Zeman R, Hirschman A, Hirschman M, Guo G, Etlinger J. Clenbuterol, a beta 2-receptor agonist, reduces net bone loss in denervated hindlimbs. *Am J Physiol*. 1991 Aug;261(2 Pt 1):E285-9.

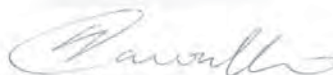
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / rigotti@fosjo.unesp.br / Guodes@fosjo.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **006/2010-PA/CEP**, sobre **“Influência da neuromodulação adrenérgica durante a indução de periodontite em ratos”** sob responsabilidade de **ANA LIA ANBINDER**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de março de 2010



Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora