



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

JULIANA BUENO SANTANA

**INFLUÊNCIA DA NEUROMODULAÇÃO PARASSIMPÁTICA
DURANTE A INDUÇÃO DA PERIODONTITE EM
CAMUNDONGOS**

2016

JULIANA BUENO SANTANA

**INFLUÊNCIA DA NEUROMODULAÇÃO PARASSIMPÁTICA DURANTE
A INDUÇÃO DA PERIODONTITE EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos
2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Santana, Juliana Bueno

Influência da neuromodulação parassimpática durante a indução da
periodontite em camundongos / Juliana Bueno Santana. - São José
dos Campos : [s.n.], 2016.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientador: Ana Lia Anbinder.

1. Sistema nervoso parassimpático. 2. Periodontite. 3.
Inibidores da colinesterase. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II.
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio
de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 22 de fevereiro de 2016
E-mail: juli_bsantana@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Denise Pontes Raldi

Faculdade de Odontologia

UNITAU – Universidade de Taubaté

Campus de Taubaté

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 22 de fevereiro de 2016

DEDICATÓRIA

A Deus, senhor único da minha existência, que me deu o dom da vida e me capacitou.

À minha família que sempre esteve presente.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram e me deram forças para realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que se fez presente em todos os momentos da minha caminhada.

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

Ao CNPq (processo 459759/2014-0) por ter financiado essa pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal e aos demais professores que se fizeram presente durante essa caminhada. À Profa Dra Mônica Fernandes Gomes, por ter aberto as portas do CEBAPE sempre que precisei.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Ana Lia Anbinder, por todo conhecimento transmitido, pelo apoio, dedicação e disponibilidade com que sempre contribuiu para a realização desse trabalho.

Aos técnicos do departamento de Biociências e Diagnóstico bucal, em especial ao Walter Cruz, que sempre esteve disponível para me ensinar e ajudar em todos os procedimentos de histotécnica.

À minha colega Mayara Fortunato Arriel, que participou desse trabalho como iniciação científica e que realizou comigo toda a fase de biotério e auxiliou nas demais análises.

Agradeço em especial à minha querida amiga de jornada, e agora amiga da vida, Renata Mendonça Moraes, que me acolheu logo

que iniciei o mestrado, me ajudou em todos os momentos e me ensinou, sempre com muita boa vontade, muitas das técnicas que aprendi e que foram essências para a realização desse trabalho. Obrigada pelas caronas até São José dos Campos, pelas longas conversas, momentos de alegria compartilhados e por ter tornado essa caminhada mais leve.

À minha querida amiga Gabriela de Moraes Gouveia Lima, companheira de equipe, que tanto me ajudou e que, assim como a Renatinha, me ensinou técnicas fundamentais para que eu pudesse realizar esse trabalho. E ainda hoje, mesmo após sua defesa, está sempre disponível como amiga e profissional.

À minha querida amiga Ana Carolina Valim, que também faz parte da equipe e que me auxiliou em todos os momentos que precisei. Obrigada por sua amizade, dentro e fora da Faculdade, pelo seu companheirismo e por sua alegria.

À minha amiga Laís Morandini Rodrigues, minha dupla de crédito, pelas conversas e por sua solicitude que não me deixaram desistir dos meus sonhos em um momento tão delicado da minha vida.

Ao meu amigo Felipe Eduardo Oliveira e à Profa Dra Luciane Dias de Oliveira que me auxiliaram na realização dos ELISAS. Fê, obrigada também por sua amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus companheiros de pós-graduação Victor Bernardes Barroso da Costa, Luciana Rocha Strieder, Elis Andrade de Lima Zutin, Noala Vicensoto Moreira Milhan, Renata Pilli Jóias que se tornaram amigos queridos. Obrigada por toda ajuda, apoio e momentos felizes que compartilhamos.

Aos demais amigos da pós: Gabriela de Fátima Santana Melo, Maria Fernanda Lima Villaça Carvalho, Milagros Del Valle El Abras Ankha, Miriane Carneiro Machado Salgado, Guilherme Rodrigues Teodoro, Patrícia Pimentel de Barros, Vivian Narana Ribeiro El Achkar, Lara Tolentino Ferreira, Rodnei Dennis Rossoni, Celina Faig Lima Carta, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Yonara Maria Freire Soares Marques, Ana Paula

Lima e Rosana Ferreira Silva, obrigada pela excelente convivência, com certeza carregarei todos vocês em meu coração.

A todas demais pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

"[Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho."

C.S. Lewis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Sistema Nervoso Autônomo e Osso	18
2.2 Inibidores da Acetilcolinesterase e sua ação na inflamação	24
2.3 Sistema Nervoso Autônomo e Doença Periodontal	26
2.3.1 Sistema nervoso simpático e doença periodontal	26
2.3.2 Sistema nervoso parassimpático e doença periodontal	27
3 PROPOSIÇÃO	31
3.1 Geral	31
3.2 Específica	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Grupos Experimentais	32
4.3 Indução da Doença Periodontal	33
4.4 Eutanásia	34
4.5 Análise Histométrica	35
4.6 Dosagem sérica de RANKL e OPG por ensaio imunoenzimático ELISA	36
4.7 Análise biomecânica dos fêmures	37
4.8 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Análise histométrica	41

5.2 Dosagem sérica de RANKL e OPG por ensaio imunoenzimático ELISA	42
5.3 Análise biomecânica dos fêmures	43
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	51
8 REFERÊNCIAS	52
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	=	Acetilcolina
AChE	=	Acetilcolinesterase
AChEIs	=	Inibidores da acetilcolinesterase
Ad β 2R	=	Adrenorreceptores β 2
AR α	=	Receptor adrenérgico α
AR β	=	Receptor adrenérgico β
AR β 2	=	Receptor adrenérgico β 2
BChE	=	Butirilcolinesterase
ChAT	=	Colina Acetiltransferase
COA	=	Crista óssea alveolar
DA	=	Doença de Alzheimer
DL		Dose letal
DP	=	Doença Periodontal
HE	=	Hematoxilina e Eosina
EDTA	=	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	=	Ensaio imunoenzimático
GC	=	Grupo controle
GD	=	Grupo donepezil
GG	=	Grupo galantamina
GL		Grupo ligadura
ICAM1	=	Molécula de adesão intercelular 1
IL	=	Interleucina
JCE	=	Junção amelo-cementária
LPS	=	Lipopolissacarídeo
mAChR	=	Receptor muscarínico da acetilcolina
nAChR	=	Receptor nicotínico da acetilcolina

NE	=	Norepinefrina
NFκB	=	Fator nuclear kapa B
OPG	=	Osteoprotegerina
RANK	=	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	=	Ligante do receptor do fator nuclear kapa B
SAP	=	Sítio Aniônico periférico
SNA	=	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	=	Sistema Nervoso Central
SNP	=	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	=	Sistema Nervoso Simpático
TGF-1β	=	Fator de crescimento transformador 1β
TNFα	=	Fator de necrose tumoral α

Santana J B. Influência da neuromodulação parassimpática durante a indução da periodontite em camundongos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma das infecções mais comuns dos seres humanos e é caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentários, incluindo o osso alveolar. Recentemente tem sido demonstrado que a regulação sistêmica da remodelação óssea é feita também por duas ramificações do Sistema Nervoso Autônomo: a simpática, que favorece a perda óssea, e a parassimpática, que favorece o acréscimo de massa óssea. O objetivo desse trabalho foi verificar, através da administração de inibidores da acetilcolinesterase, o efeito da neuromodulação parassimpática na DP induzida e no tecido ósseo em camundongos. Foram utilizados 40 camundongos machos, divididos em 4 grupos: (1) Grupo Galantamina (G), dez animais com DP induzida e tratados com 3 mg/Kg/dia de Galantamina; (2) Grupo Donepezil (D), dez animais com DP induzida e tratados com 2 mg/Kg/dia de donepezil; (3) Grupo Ligadura (L), dez animais com DP induzida; e (4) Grupo Controle (C). A indução da doença periodontal foi realizada com a inserção de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores e o tratamento durou 42 dias. No dia do sacrifício, amostras de sangue foram coletadas para análise sorológica do fator nuclear κ B ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). As hemimandíbulas esquerdas foram submetidas à análise histomorfométrica e os fêmures esquerdos, ao teste de flexão em três pontos para avaliação das propriedades extrínsecas e intrínsecas. O uso dos medicamentos não reduziu a perda óssea alveolar dos grupos tratados. Também não foram observadas diferenças estatísticas significantes com relação às propriedades biomecânicas dos fêmures ou à concentração sérica de RANKL e OPG. Concluímos que a galantamina e o donepezil, nas doses e período utilizados, não influenciaram a patogênese da DP ou a remodelação óssea sistêmica.

Palavras-chave: Sistema nervoso parassimpático. Periodontite. Inibidores da colinesterase.

Santana J B. Influence of parasympathetic neuromodulation during periodontitis induction in mice [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is one of the most common infections of human beings, and it is characterized by destruction of tooth supporting tissues, including alveolar bone. Recently it has been shown that the systemic regulation of bone remodeling is also made by two branches of the autonomic nervous system: the sympathetic, favoring bone loss and the parasympathetic, which promotes increase of bone mass. The aim of this study was to verify, through the administration of acetylcholinesterase inhibitors, the effect of parasympathetic neuromodulation in induced periodontitis and bone tissue in mice. Forty male mice were divided into 4 groups: (1) Group Galantamine (G), ten animals with induced PD and treated with 3 mg/ kg/day of galantamine; (2) Donepezil group (D), ten animals with induced PD and treated with 2 mg/kg/day of donepezil; (3) Ligature group (L), ten animals with induced PD; and (4) control group (C). The induction of periodontal disease was carried out with a cotton thread insertion around the lower first molars and the treatment lasted 42 days. On the day of sacrifice, animals blood samples were collected for serological analysis of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). The left hemimandibles were submitted to histomorphometric analysis and the left femur to the three point bending test for assessment of extrinsic and intrinsic properties. The use of the drugs did not reduce alveolar bone loss in treated groups. No statistically significant differences regarding the biomechanical properties of femurs or serum RANKL and OPG were observed. We conclude that galantamine and donepezil, at doses and time used, did not influence the pathogenesis of PD or systemic bone remodeling.

Keywords: Parasympathetic nervous system. Periodontitis. Cholinesterase inhibitors.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma das infecções mais comuns dos seres humanos, e é caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentários, incluindo o osso alveolar, podendo levar à perda dos dentes (Jin et al., 2003; Koide et al., 2010). Ela afeta 10-15% da população mundial, sendo considerada o segundo maior problema de saúde bucal (Palma et al., 2013), e está associada com diversas condições sistêmicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e osteoporose (Otomo-Corgel et al., 2012). Apesar de bactérias anaeróbias Gram-negativas, como por exemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e a *Porphyromonas gingivalis* serem a principal causa da periodontite, é a resposta do hospedeiro que determina a progressão da doença. Em vários casos, a resposta do hospedeiro à presença bacteriana é reversível e associada com a gengivite. Por outro lado, sob certas condições que não são totalmente compreendidas, a doença pode progredir e causar destruição dos tecidos de suporte dentário (Graves et al., 2011; Bartold, Van Dyke, 2013). A resposta inicial à infecção bacteriana é uma reação inflamatória local que ativa o sistema imune inato e a amplificação dessa resposta resulta na destruição dos tecidos periodontais moles e do osso alveolar (Cochran, 2008; Di Benedetto et al., 2013).

A remodelação óssea, processo que envolve reabsorção seguida pela formação de osso, é regulada por uma complexa rede composta por fatores locais e sistêmicos que tem a função de manter a massa óssea através da formação pelos osteoblastos e reabsorção pelos osteoclastos (Bataille et al., 2012). Tradicionalmente, o controle da remodelação óssea é associado a mecanismos autócrinos/ parácrinos, hormonais e mecânicos. Mais recentemente tem sido demonstrado que a

regulação sistêmica da remodelação óssea também é feita por duas ramificações do Sistema Nervoso Autônomo (SNA): a adrenérgica ou simpática e a colinérgica ou parassimpática, sendo que a atividade adrenérgica favorece a perda óssea enquanto a atividade colinérgica favorece o acréscimo de massa óssea (Eimar et al., 2013a; Elefteriou et al., 2014).

Na maior parte dos sistemas biológicos, o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é antagonizado ou complementado pelo sistema nervoso parassimpático (SNP) (Bajayo et al., 2012). A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor do SNP, e atua através de receptores nicotínicos e muscarínicos, sendo que esses já foram identificados nas membranas de células ósseas humanas primárias, em osteoblastos e osteoclastos (Eimar et al., 2013a). A ACh está envolvida em várias funções e deficiências cognitivas, tais como a doença de Alzheimer (DA) (Aggelopoulos et al., 2011). Nos mamíferos, a acetilcolina é sintetizada e secretada no sistema nervoso e em uma variedade de células não neuronais. Além de atuar como neurotransmissor, a acetilcolina também pode exercer influência sobre funções celulares básicas, que incluem a proliferação e diferenciação, e é degradada pela acetilcolinesterase (AChE) e pela butirilcolinesterase (BChE) em colina e acetato (Ma et al., 2014).

Uma forma de estimular a atividade colinérgica é a administração de agonistas, como inibidores da acetilcolinesterase, fármacos utilizados para o tratamento dos sintomas da DA (Tamimi et al., 2012), que é a forma mais proeminente de demência e que afeta os idosos com elevada incidência (Fang et al., 2014). A DA é uma síndrome multifatorial derivada a partir de uma complexa matriz de fatores neuroquímicos, incluindo a deficiência de ACh sináptica, a formação de β -amiloide neurotóxico, estresse oxidativo e inflamação dos neurônios.

Os inibidores da AChE (AChEIs) aumentam a transmissão colinérgica diretamente através da inibição da enzima AChE, responsável por hidrolisar a ACh. A acetilcolina pode atuar através de duas classes

diferentes de receptores: os receptores nicotínicos e muscarínicos (Anand, Singh 2013).

A influência dos AChEIs tem sido estudada sobre a remodelação óssea em pacientes com DA e associada à redução do risco de fraturas de quadril (Tamimi et al., 2012). Pacientes com DA que sofreram fratura de quadril e que fizeram uso de AChEIs tiveram uma melhor união radiográfica nos sítios de fratura, melhor qualidade óssea e menos complicações na cicatrização (Eimar et al., 2013b).

Processos inflamatórios sistêmicos como DP podem estar associados com a DA. Os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- α (Holmes et al., 2009; Kamer et al., 2009) e de anticorpos contra bactérias da doença periodontal se mostraram elevados no soro de pacientes com DA quando comparados a pacientes considerados cognitivamente normais, sugerindo que a doença periodontal pode contribuir potencialmente para o início e progressão da DA (Stein et al., 2012).

Kamer et al. (2008) propuseram dois mecanismos através dos quais a DP pode induzir a progressão da DA. O primeiro mecanismo implica que as moléculas inflamatórias derivadas da DP aumentam a inflamação no cérebro. Tais moléculas pró-inflamatórias podem também induzir inflamação sistêmica e, portanto, podem acessar o cérebro através da circulação. Moléculas pró-inflamatórias derivadas a partir de tecido periodontal também podem estimular fibras do nervo trigêmeo, levando ao aumento de citocinas cerebrais. Estas citocinas podem atuar sobre as células gliais previamente imunizadas resultando numa reação amplificada e eventual progressão da DA. O segundo mecanismo pelo qual a DP poderia contribuir para a inflamação do cérebro seria por meio de bactérias e/ou produtos bacterianos. Várias bactérias, incluindo as bactérias orais podem estar implicadas na patogênese de DA. Entre as bactérias periodontais, espécies como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *F. nucleatum* são capazes de invadir o cérebro, mudando o

meio de citocinas e podendo assim contribuir para mecanismos patológicos existentes.

Por outro lado, existem muitos fatores de risco relacionados à DA, e um dos principais deles é a idade avançada, sendo que cerca de 50% dos pacientes acometidos por essa doença apresentam mais de 85 anos. De maneira geral a qualidade de vida e as condições de saúde geral dos pacientes idosos é reduzida e eles podem também apresentar dificuldades de coordenação motora, aumentando assim o risco de desenvolver complicações dentárias e periodontais, devido à incapacidade de realizar a higiene bucal (Cicciu et al., 2013).

Seguindo a linha dos estudos que comprovaram o envolvimento do SNS e o SNP na remodelação óssea sistêmica, alguns autores têm demonstrado o envolvimento do SNA no periodonto e em DP. Em estudo do nosso grupo de pesquisa, verificamos que a estimulação do SNS com isoproterenol aumentou a perda óssea alveolar durante a periodontite induzida (Martins, 2011), o que corrobora os estudos anteriores (Breivik et al., 2005; Kim et al., 2009; Okada et al., 2010), indicando que o SNS está envolvido na patogênese da periodontite.

Dado que os inibidores da AchE têm sido associados a aumento de qualidade óssea e atividade anti-inflamatória, seu uso em DP, doença inflamatória caracterizada pela perda óssea alveolar, pode ser aventado. Associado a isto, tais medicamentos são usados para o tratamento da DA, doença que apresenta uma relação bidirecional com a DP, em que ambas se agravam mutuamente. Assim, o estudo da utilização de um único medicamento benéfico para ambas as doenças prevalentes em indivíduos idosos é relevante. Frente ao exposto, o objetivo do nosso trabalho é verificar, através da administração da Galantamina e Donepezil, substâncias inibidoras da acetilcolinesterase, o efeito da neuromodulação parassimpática na patogênese da periodontite induzida e no tecido ósseo em camundongos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema nervoso autônomo e osso

Grande parte das funções corporais são controladas pelo SNA, e a regulação precisa das funções de órgãos e tecidos por esse sistema requer a afinação de seus dois braços eferentes: o SNS e o SNP (Ondicova, Mravec, 2010).

O SNS parte do sistema nervoso central através de neurônios pré-ganglionares localizados principalmente na medula espinhal torácica. Esses neurônios se projetam para todos os órgãos e maioria dos tecidos do corpo. Embora a maioria dos neurônios simpáticos utilizem a noradrenalina (norepinefrina) como neurotransmissor principal, existem populações neuronais não-adrenérgicas bem definidas. As diferentes populações de neurônios simpáticos expressam neuropeptídeos, incluindo o neuropeptídeo Y, galanina, somatostatina e opioides (Gibbins, 2013).

Os neurônios do sistema nervoso parassimpático utilizam a acetilcolina (ACh) ou o óxido nítrico como neurotransmissores primários (Gibbins, 2013). A ACh é uma molécula que exerce tanto o papel de neurotransmissor como o de funções autócrinas. As ações celulares da ACh são mediadas por duas famílias distintas de receptores de membrana: os receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR), que são compostos por múltiplos subtipos expressos pré e pós-sinapticamente e distribuídos pelos sistemas nervoso central e periférico, além de estarem presentes em diversos tecidos não inervados (Eglen et al., 2006). A degradação da ACh é catalisada pela AChE, uma das enzimas mais

eficientes da natureza, que tem como papel primário hidrolisar a ACh sináptica. As propriedades da AChE são modificadas em muitas neuropatologias, o que impede o equilíbrio entre a estimulação neuronal e a terminação nervosa, alterando as propriedades sinápticas e de neurotransmissão (Meshorer et al. 2006).

Muitos trabalhos têm avaliado o papel do sistema nervoso autônomo na remodelação óssea. Estudos histológicos demonstraram que o osso e o periósteo recebem um rico suprimento de fibras nervosas sensoriais e simpáticas, com densidade maior próximo as áreas de crescimento ósseo (Serre et al., 1999; Chenu, Marenzana, 2005; Bonnet et al., 2008) e, além disso, receptores β -adrenérgicos ($AR\beta$) e de neuropeptídeos podem ser detectados em osteoblastos e osteoclastos (He et al., 2011).

Bonnet et al. (2008) revisaram o papel do sistema adrenérgico na regulação do metabolismo ósseo *in vitro* e *in vivo* fornecendo algumas novas evidências para o duplo papel dos $AR\beta$ na remodelação óssea. A sinalização mediada pelo receptor adrenérgico nos osteoblastos inibe a formação óssea e induz à osteoclastogênese, mediada pelo fator nuclear κB (RANK) ligante (RANKL), e à reabsorção óssea. Ratos com deficiência adrenérgica têm aumento da massa óssea e mais especificamente aumento do volume ósseo trabecular e a utilização de β -bloqueadores, como o propranolol, inibe a perda óssea induzida por ovariectomia. Em contrapartida, muitos estudos em ratos e camundongos têm demonstrado que a inibição da sinalização mediada pelos β -bloqueadores pode não melhorar e ser prejudicial para a microestrutura óssea (De Vries et al., 2007; Collomp et al., 2005; Schwartzman 2000). Em humanos, estudos epidemiológicos sugerem que pessoas que fazem uso de β -bloqueadores tem maior densidade mineral óssea com redução do risco de fraturas (Pasco et al., 2004; Schlienger et al. 2004).

Eleftheriou et al. (2014), por meio de uma revisão de literatura, avaliaram o papel do SNS e dos $AR\beta$ sobre a homeostase do

tecido ósseo. O periósteo e os ossos corticais são ricamente innervados. A innervação periosteal consiste, principalmente, em uma rede extremamente densa de fibras sensoriais que são sensíveis à estimulação mecânica e dor. O periósteo também recebe suprimento de fibras nervosas simpáticas e muitas dessas fibras penetram no osso cortical. Os nervos simpáticos liberam Norepinefrina (NE) e assim ativam os AR β pós-sinápticos. A expressão dos AR β especialmente AR β 2 já foi confirmada em várias linhagens celulares e em osteoblastos primários de calvária de camundongo, mostrando ter profunda influência sobre a remodelação óssea. A estimulação dos AR β por meio de fármacos agonistas em ratos e camundongos provoca resposta osteoclastogênica, aumentando a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Esse efeito é causado principalmente pelo aumento da expressão de RANKL e Interleucina (IL)-6. Embora o papel dos AR β pós-sinápticos tenha sido bem estabelecido ao menos em modelos animais, estudos mais recentes tem elucidado a importância dos receptores α -adrenérgicos (AR α) e suas possíveis diferenças entre a estimulação do AR β por fármacos na regulação da homeostase óssea.

O SNS é antagonizado ou complementado pelo SNP e, recentemente, a regulação da remodelação óssea pelo SNP tem sido alvo de diversos estudos.

A regulação óssea pelo sistema nervoso parassimpático é realizada por duas vias principais: na primeira delas ocorre a ativação mAChR M3, expressos em neurônios não adrenérgicos localizados em uma região do cérebro importante para o SNS, chamada *Locus coeruleus*, o que acaba levando à inibição do SNS. A segunda ocorre através da sinalização central de IL-1, pelo eixo osso-SNP-IL-1 (Figura 1) (Eimar et al., 2013a).

Camundongos *knockout* para mAChR M3 e *knockout* condicional para esses receptores apenas nos neurônios localizados no *Locus coeruleus* possuem um fenótipo de massa óssea reduzida,

apresentando osteoporose, além de diminuição da concentração de adrenalina urinária, evidenciando que tal receptor é um regulador positivo para a formação do osso e que o SNP pode favorecer o acréscimo de massa óssea através inibição da atividade do SNS (Shi et al., 2010). A inervação óssea pelo SNP regula também positivamente o acréscimo de massa óssea através da sinalização central de IL-1, uma citocina pró-inflamatória produzida pelos neurônios cerebrais que pode levar à apoptose dos osteoclastos através dos nAChR que estão presentes nessas células, restringindo assim a reabsorção óssea. Ratos deficientes do nAChR $\alpha 2$ apresentam aumento da reabsorção e reduzida massa óssea (Bajayo et al., 2012; Eimar et al., 2013a).

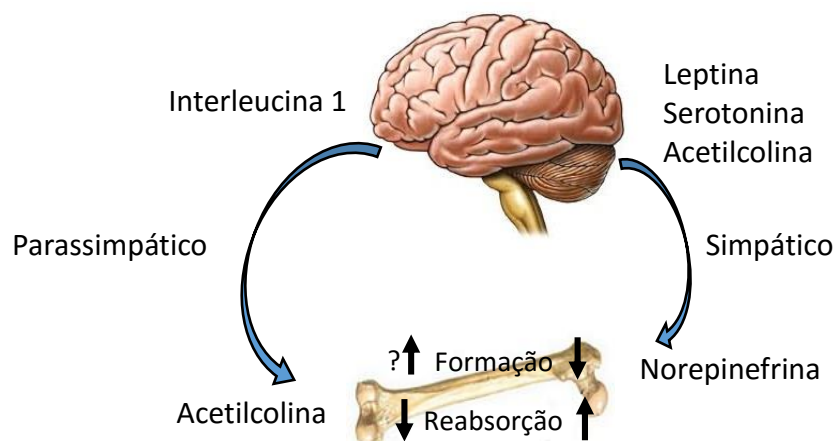


Figura 1 - Modelo de remodelação óssea regulada pelo SNA. O SNS inibe a formação óssea e estimula a reabsorção e é centralmente regulado por leptina, serotonina e acetilcolina. O SNS é antagonizado pela atividade do SNP, controlada pela sinalização de IL-1 cerebral, que resulta no aumento da formação óssea e inibição da reabsorção*.

Na figura 2 pode-se observar um resumo dos mecanismos envolvidos na regulação da remodelação óssea pelo sistema nervoso autônomo.

* Figura baseada no artigo de Bajayo, A. et al. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 Set. 18;109 (38):15455-60

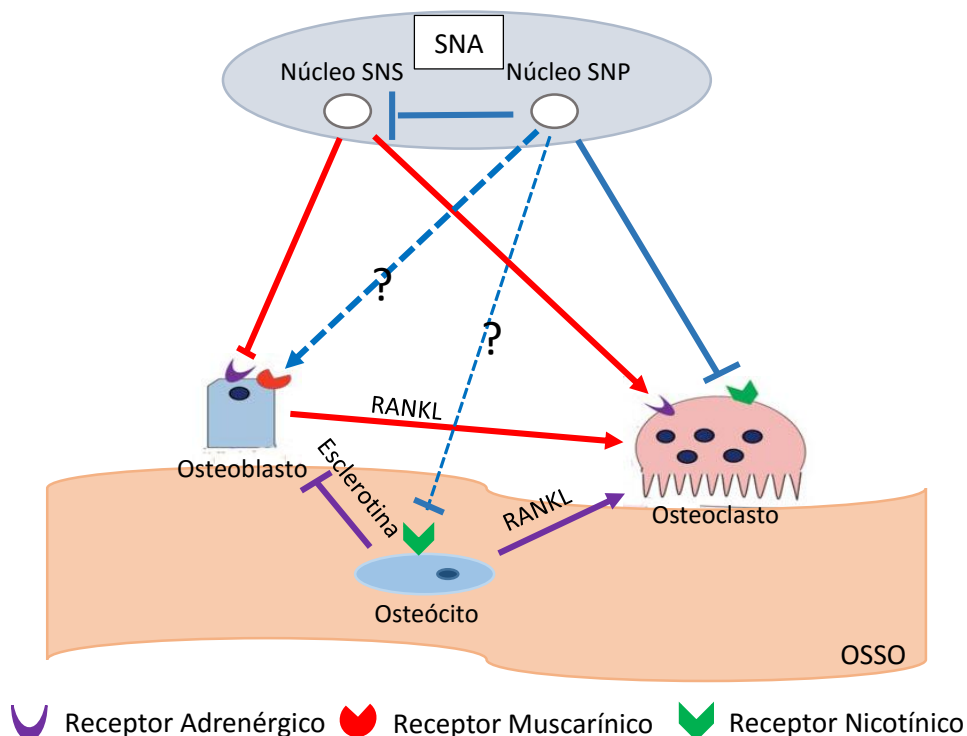


Figura 2 - Modelo de remodelação óssea mediada pelo SNA. O SNS favorece a perda óssea ativando os receptores adrenérgicos dos osteoblastos e assim inibindo a sua proliferação, ou através da promoção da proliferação osteoclástica. A proliferação dos osteoclastos também pode ser induzida indiretamente através da produção de RANKL pelos osteoblastos. O SNP favorece o acréscimo de massa óssea através da supressão do SNS ou pela indução de apoptose dos osteoclastos através da ativação dos receptores nicotínicos. As setas azuis tracejadas referem-se ao possível efeito do SNP sobre osteoblastos e osteócitos que expressam vários subtipos do receptor[†].

Recentemente foi publicado um resumo pelo grupo de pesquisas em biologia óssea da Universidade de Vanderbilt nos Estados Unidos (Ma, Elefteriou, 2015) na reunião anual da *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) no qual foi demonstrado, que os animais tratados com donepezil e galantamina, agonistas do SNP que alcançam o Sistema Nervoso Central (SNC), tiveram aumento significativo da remodelação óssea, com aumento da porcentagem de volume ósseo. O

[†]Figura baseada no artigo de Eimar, H. et al. Cholinergic regulation of bone. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2013. 13(2): p. 124-132

mesmo não aconteceu com camundongos tratados com rivastigmina, um AChEI que não ultrapassa a barreira hematoencefálica.

Ma et al. (2014) identificaram a expressão gênica dos nAChR e mAChR em tíbia de camundongos e em osteócitos MLO-Y4. Segundo os autores, a acetilcolina não influencia apenas a expressão de mRNA das subunidades dos receptores de ACh, mas também induz significativamente a proliferação e viabilidade dos osteócitos. Além disso, o tratamento com ACh aumentou significativamente a taxa de mRNA de RANKL e osteoprotegerina (OPG) nos osteócitos via receptores da ACh. Os autores concluíram que os receptores da ACh nos osteócitos podem ser um mediador valioso para as funções celulares além de controlar a remodelação óssea.

Além da ACh, a nicotina também pode se ligar aos nAChR e assim, atuar sobre as células. Os estudos descritos a seguir evidenciam que a nicotina atua sobre o tecido ósseo de maneira dose dependente.

Kim et al. (2011) avaliaram os efeitos da nicotina sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos derivados da medula óssea alveolar. As células receberam tratamento com diferentes doses de nicotina (de 1 μ M a 5mM). A sobrevivência e proliferação dos osteoblastos não diferiu quando foram expostos a concentrações variando entre 1 a 100 μ M, no entanto, a proliferação celular foi aumentada quando as células foram expostas à nicotina em concentrações de 1 a 2mM e diminuiu significativamente quando expostos a 5mM de nicotina. Esses resultados demonstraram que a nicotina tem um efeito bimodal sobre a proliferação e diferenciação dos osteoblastos.

Daffner et al. (2012) trataram osteoblastos derivados de medula óssea de coelho com diferentes concentrações de nicotina (0, 20, 40, 80 ng/mL e 10, 100, 250 μ g/mL). Foi observado que o grupo tratado com 100 μ g/mL de nicotina apresentou aumento significativo da atividade de fosfatase alcalina, e que os grupos tratados com doses de 100 e 250

µg/mL apresentaram mineralização significativamente maior em relação aos controles.

Marinucci et al. (2014) avaliaram os efeitos da exposição crônica ou aguda de doses sub-tóxicas de nicotina em osteoblastos humanos. O crescimento celular, a expressão de genes envolvidos na diferenciação óssea e o metabolismo de matriz extracelular foram investigados em células tratadas e não tratadas. Os autores demonstraram que a nicotina, mesmo em doses sub-tóxicas, pode suprimir a formação de osso, retardando os processos de cicatrização e regeneração, através do comprometimento das vias de sinalização de fatores de crescimento e do metabolismo de matriz extra-celular.

2.2 Inibidores da acetilcolinesterase e sua ação na inflamação

O sistema nervoso parassimpático pode ser estimulado através da administração de inibidores da enzima AChE, medicamentos utilizados no tratamento dos sintomas da DA.

Atualmente estão disponíveis comercialmente, para o tratamento da DA três inibidores da acetilcolinesterase: donepezil, galantamina e rivastigmina (Fang et al., 2014). O donepezil interage com o sítio aniônico periférico (SAP) da AChE através de ligações aromáticas (Anand e Singh, 2013) e embora sua principal aplicação terapêutica seja para o tratamento da DA leve a moderada, alguns estudos clínicos também indicam que o donepezil melhora a função cognitiva em pacientes no estágio avançado da doença (Colović et al., 2013). A galantamina também é utilizada no tratamento dos sintomas da DA leve a moderada e apresenta um mecanismo duplo no sistema colinérgico: ela inibe a AChE juntamente com a modulação alostérica (Anand, Singh, 2013), aumentando a sensibilidade do receptor nicotínico na presença de ACh. A rivastigmina

também é utilizada para o tratamento da DA leve a moderada. É um inibidor poderoso, lentamente reversível que bloqueia a atividade da colinesterase através da ligação com o sítio ativo dessa enzima. Ao contrário de donepezil, que inibe seletivamente AChE, a rivastigmina inibe tanto BuChE quanto AChE (Colovic et al. 2013).

A função de agonistas do SNP também tem sido investigada sobre processos inflamatórios.

Zabrodskii et al. (2012) investigaram os efeitos da inibição reversível da AChE e do tratamento com nicotina sobre a mortalidade de camundongos na fase precoce da sepse e nos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. A administração de proserina (inibidor reversível da AChE) e nicotina (agonista nAChR) em doses únicas de 0,2DL (dose letal)₅₀ (a DL₅₀ desses agentes, para camundongos, é de 0.55 $\pm$ 0.10 e 35 $\pm$ 4mg/kg, respectivamente), injetadas 2 horas antes da indução da sepse causa redução significativa da mortalidade dos camundongos por infecção devido à redução das concentrações sanguíneas de TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Liu et al. (2010) avaliaram o efeito da galantamina sobre os níveis de TNF- α circulante em ratos com peritonite induzida por lipopolissacarídeos (LPS). O nível de TNF- α circulante aumentou significativamente nos ratos após a injeção intraperitoneal de endotoxina, e foi reduzido após o tratamento com galantamina.

Silva-Herdade e Saldanha (2013) avaliaram o efeito da administração intravenosa de um inibidor da AChE, maleato de velnacrina e de ACh na resposta inflamatória induzida por LPS em ratos. O número de leucócitos nas fases de rolamento e aderidos aos vasos foi monitorado por meio de microscopia intravital e amostras de sangue foram coletadas para determinação da concentração de TNF- α plasmática. Na presença de LPS, a ACh tem efeito anti-inflamatório visto pela diminuição da concentração plasmática de TNF- α e manutenção do número de leucócitos em rolamento e aderidos. O tratamento com maleato de velnacrina antes

do LPS bloqueou parcialmente o rolamento de leucócitos assim como a liberação de TNF- α . Os autores concluíram que o maleato de velnacrina e a ACh têm efeito anti-inflamatório devido à diminuição das concentrações de TNF- α .

Uma vez que tais estudos demonstraram que os agonistas do SNP desempenham importante função sobre processos inflamatórios, a sua função na DP, doença inflamatória crônica, pode ser proposta.

2.3 Sistema nervoso autônomo e doença periodontal

O SNA também tem sido associado à progressão da doença periodontal.

2.3.1 Sistema nervoso simpático e doença periodontal

O bloqueio de AR β por propranolol, um medicamento frequentemente utilizado no controle da hipertensão arterial, inibe a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL e reduz a perda de osso alveolar (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012). Obloqueio da sinalização simpática também inibe a movimentação dentária e o aumento de osteoclastos, enquanto a estimulação simpática acelera esses processos (Kondo et al., 2013).

Breivik et al. (2005) estudaram os efeitos da simpatectomia química, em ratos com periodontite induzida por ligadura, meio da substância neurotóxica 6-hidroxidopamina e observaram que houve menor perda alveolar nos ratos simpatectomizados com relação ao grupo controle, demonstrando o envolvimento do SNS na patogênese da DP.

Okada et al. (2010) investigaram os efeitos do β -bloqueador propranolol na perda óssea alveolar induzida por *Porphyromonas gingivalis* em ratos e observaram que o bloqueio dos AR β por propranolol no tecido periodontal inibiu a diferenciação dos osteoclastos e preveniu a perda óssea alveolar.

Shimizu et al. (2011) avaliaram os efeitos da atividade nervosa simpática na perda óssea alveolar induzida por hipofunção oclusal em molares de ratos tratados com propranolol e observaram que nesses ratos ocorreu menor perda óssea alveolar, sugerindo que a atividade nervosa simpática exerce influência sobre a perda óssea alveolar induzida por hipofunção oclusal.

Rodrigues et al. (2012) investigaram os efeitos do propranolol em modelo experimental de doença periodontal. Os ratos tratados com 0,1 e 5 mg/kg de propranolol tiveram reabsorção óssea reduzida assim como redução da expressão de Molécula de adesão celular 1 (ICAM)-1 e RANKL, porém apenas o grupo tratado com 0,1mg/kg de propranolol apresentou redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α e aumento da expressão de OPG. Os autores concluíram que baixas doses de propranolol suprimem a reabsorção óssea pela inibição da osteoclastogênese mediada por RANKL.

2.3.2 Sistema nervoso parassimpático e doença periodontal

Alguns estudos também foram desenvolvidos observando a influência do SNP na DP, através dos nAChR e mAChR

Nguyen et al. (2000) demonstraram a presença de enzimas colinérgicas e de nAChR em queratinócitos gengivais utilizando amostras de gengiva humana normal obtidas a partir de procedimentos cirúrgicos periodontais. Os queratinócitos gengivais humanos expressam nAChR

funcionais, o que pode levar essas células a sofrerem efeitos diretos da nicotina. A síntese de ACh no epitélio gengival é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), indicando a atividade do sistema colinérgico nessas células. A presença de mRNA codificando as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ e $\beta 2$ do nAChR foi observada nos queratinócitos gengivais. Também foi demonstrado que essas células apresentam um sistema colinérgico funcional não-neuronal para a tradução de sinais, com a ACh como único citotransmissor. Esse sistema inclui a enzima ChAT, duas formas moleculares da enzima AChE e dois tipos de receptores colinérgicos: nicotínico e muscarínico.

Arredondo et al. (2003) investigaram a presença e função dos mAChR em queratinócitos gengivais humanos. Observou-se que as subunidades m2, m3, m4 e m5 do mAChR são expressas em queratinócitos gengivais humanos normais. As moléculas receptoras são abundantemente expressas na membrana celular onde elas podem se ligar à ACh e à drogas colinérgicas muscarínicas. A cascata de sinalização dos mAChR segue através de uma via que ativa a expressão de reguladores do ciclo celular, o que mostra um importante papel do eixo queratinócitos-ACh na biologia oral.

Breivik et al. (2009) investigaram os mecanismos biológicos pelos quais a nicotina pode aumentar a susceptibilidade da DP em modelos animais através do tratamento com mecamilamina, um antagonista do nAChR. O tratamento crônico com nicotina aumenta a progressão da periodontite induzida por ligadura e o pré-tratamento com a mecamilamina diminuiu essa progressão. Os animais tratados com nicotina também tinham níveis séricos significativamente mais baixos de TNF- α e das citocinas anti-inflamatórias fator de crescimento transformador (TGF)- 1β e IL-10. A redução de TNF- α foi revertida pelo pré-tratamento com mecamilamina, sendo assim, o agravamento da doença periodontal pode ser bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista do nAChR,

mecamilamina, evidenciando o papel desses inibidores durante a progressão da periodontite.

Wang et al. (2010) investigaram se o nAChR $\alpha 7$ estava expresso nos tecidos periodontais e se esse receptor exerce alguma função no controle de IL-1 β na DP. A administração de nicotina e α -bungarotoxina (antagonista do nAChR $\alpha 7$) foi avaliada *in vitro*, em células humanas do ligamento periodontal, e *in vivo*, em ratos. O nAChR $\alpha 7$ estava presente tanto nas células do ligamento periodontal humanas quanto nos tecidos periodontais de ratos. A expressão do nAChR $\alpha 7$ e de IL-1 β foram significativamente aumentadas pela administração de nicotina, enquanto que o tratamento com α -bungarotoxina suprimiu esses efeitos.

Apesar de muitos estudos terem demonstrado que a nicotina é prejudicial aos tecidos periodontais, aumentando o risco de DP destrutiva (Bergstrom 2004; Heasman et al., 2006), Wang et al. (2009) levantaram a hipótese de que existe um sistema colinérgico não-neuronal nos tecidos periodontais que é ativado pelo excesso de nicotina, o que aumenta a expressão de AChE (que é potencialmente um marcador e regulador de apoptose em diversos tipos celulares (Zhang et al., 2002)), aumentando assim, a apoptose das células periodontais. Sendo que, segundo Gamona et al. (2001), a apoptose é induzida no tecido periodontal por fatores microbianos e do hospedeiro, suportando a hipótese de que os mecanismos de apoptose podem estar envolvidos no processo inflamatório associado com a destruição do tecido gengival observado em pacientes com periodontite. Se assim for, a administração de inibidores da AChE deve diminuir a apoptose das células do tecido periodontal, diminuindo consequentemente a DP (Wang et al., 2009).

Embora diversos autores na literatura tenham descrito os efeitos da nicotina como prejudiciais aos tecidos periodontais e como um fator agravante da periodontite, existem fatores importantes a serem considerados: a diferença na estimulação dos nAChRs exercida pela ACh e a nicotina; o papel da AChE na apoptose de diversos tipos celulares,

incluindo células do tecido periodontal e principalmente o fato de o que o estímulo do SNP está associado ao aumento de massa óssea. Sendo assim, hipotetizamos que o tratamento com agonistas do SNP (inibidores da AChE) poderia reduzir a perda óssea associada a DP.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

Avaliar a influência da neuromodulação parassimpática durante a indução de periodontite em camundongos.

3.2 Específica

Determinar os efeitos do tratamento com Donepezil e Galantamina no periodonto e tecido ósseo em camundongos, por meio da avaliação de:

- a) perda óssea alveolar microscópica na região distal e da furca do primeiro molar inferior;
- b) propriedades biomecânicas dos fêmures;
- c) concentração sérica de RANKL e OPG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos Swiss (*Mus musculus*), com quatorze semanas de idade, pesando em média 54 gramas, que foram mantidos no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos e alimentados com ração e água *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu as recomendações da lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da nossa Unidade (03/2014-CEUA/ICT-CJSC-UNESP) (Anexo A).

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente, em quatro grupos:

- (a) Grupo Donepezil (D): Dez animais em que foi induzida doença periodontal por meio de ligadura de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores e receberam 2 mg/Kg/dia (Jiang et al., 2013) de Donepezil (Figura 3a) por 42 dias por via oral, através de gavagem;
- (b) Grupo Galantamina (G): Dez animais em que foi induzida doença periodontal e receberam 3 mg/Kg/dia

(Yano et al., 2009) de Galantamina (Figura 3b) por 42 dias por via oral, através de gavagem;

(c) Grupo Ligadura (L): dez animais em que foi induzida doença periodontal e receberam apenas o veículo de dissolução dos medicamentos testados através de gavagem por 42 dias;

(d) Grupo Controle (C): dez animais em que não foi induzida doença periodontal, e receberam o veículo de dissolução dos medicamentos testados através de gavagem (Figura 3c) por 42 dias.



Figura 3 - a) Embalagem do donepezil comercial (cloridrato de donepezila); b) Embalagem da galantamina comercial (bromidrato de galatamina, Reminyl® ER); c) animal recebendo o medicamento por gavagem.

4.3 Indução da doença periodontal

Todos os animais, previamente pesados, foram anestesiados com uma mistura de quetamina (Sespo, Paulínia, SP, Brasil) (100-150 mg/Kg) e xilazina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil) (10-15 mg/Kg)

por via intramuscular. Para indução da doença periodontal, que foi realizada através da inserção de uma volta de fio de algodão 3-0 ao redor dos primeiros molares inferiores dos animais (Figura 4), os camundongos anestesiados foram imobilizados em mesa apropriada, na qual permaneceram com a boca aberta. A ligadura foi mantida durante todo o período experimental. Nos animais do grupo C não foi induzida doença, mas eles foram anestesiados e manipulados da mesma maneira que os demais. O tratamento medicamentoso, de acordo com o grupo, foi iniciado no dia seguinte à inserção da ligadura.

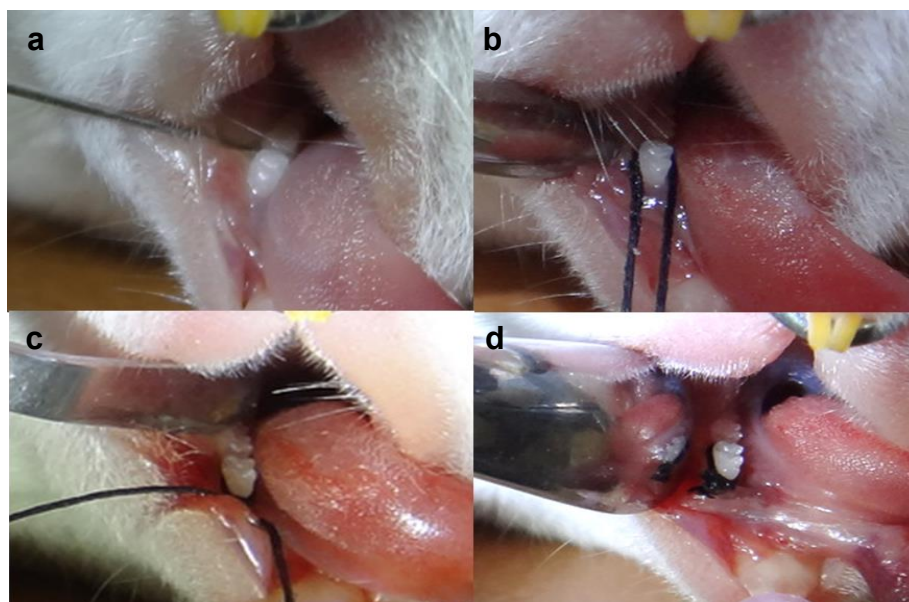


Figura 4 - Procedimento de colocação de ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito em camundongo: a) Abertura do ponto de contato entre o primeiro e segundo molares inferiores com auxílio de um espaçador endodôntico; b) colocação do fio de sutura; c) uma volta do fio ao redor do primeiro molar inferior; d) amarra do fio na mesial do primeiro molar inferior.

4.4 Eutanásia

Transcorridos 42 dias de tratamento, os animais foram novamente anestesiados intramuscularmente com quetamina (100-150

mg/Kg) e xilazina (10-15 mg/Kg). Após pesagem, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão longitudinal da região púbica até o processo xifoide, abrindo a caixa torácica com a exposição do coração, onde foi introduzida uma agulha acoplada a um tubo com gel separador de soro (Tubo gel BD SST® II Advance BD, São Paulo, SP, Brasil) no ventrículo esquerdo, para coleta de cerca de 1 ml de sangue. Em seguida os animais foram eutanasiados por decapitação e foram removidas as hemimandíbulas direita e esquerda e o fêmur direito. As hemimandíbulas esquerdas foram armazenadas em uma solução de paraformaldeído 4% tamponado (tampão fosfato pH 7,4; 0,1M) durante 48 horas e em seguida transferidas para álcool 70% e armazenadas a 4 °C. Os fêmures esquerdos foram envolvidos em uma gaze embebida com solução de Ringer e armazenados à -20 °C. O sangue coletado permaneceu em temperatura ambiente para coagulação durante 2 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, durante 15 minutos, quando então o soro foi coletado e mantido a -20 °C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.5 Análise histométrica

Para avaliação histológica, as hemimandíbulas fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Merck, Billerica, MA, EUA), 0,5M, pH7,8, e posteriormente incluídas em parafina com a face lingual voltada para a superfície de corte. Foram, então, obtidos cortes de 5µm de espessura, montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram utilizadas nove amostras por grupo.

A análise histomorfométrica foi realizada usando-se o programa ImageJ 1.31p (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Cinco cortes semisseriados por espécime, distantes 15 μm entre si, corados com HE, foram digitalizados em aumento de 50x. Foi medida então a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) da distal do primeiro molar inferior e a crista óssea alveolar distal (COA) (perda óssea alveolar distal). Também foi obtida a medida da área entre o septo interradicular e a superfície cementária na região de furca (perda óssea alveolar em furca) (Figura 5).

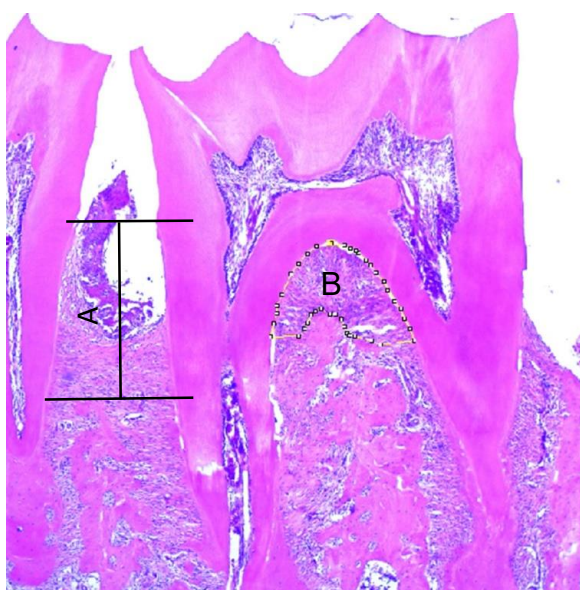


Figura 5 - Análise histométrica. A) Distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar distal e B) delimitação da área de perda óssea na região de furca. Coloração com hematoxilina e eosina (HE) em aumento original de 50 vezes.

4.6 Dosagem sérica de RANKL e OPG por ensaio imunoenzimático ELISA

Os testes foram realizados, em duplicata, conforme instruções do fabricante de cada kit: RANKL (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e OPG (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Para avaliação das concentrações totais de RANKL e OPG, primeiramente as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e todos os reagentes e padrões foram preparados. Cinquenta microlitros de cada amostra ou padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, após o quê 50 µl do “reagente de detecção A” foram adicionados. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado por 4 vezes com tampão de lavagem. Cem microlitros do “reagente de detecção B” foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado por 5 vezes e 100µl da “solução de substrato” foram adicionados aos poços, para incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 100 µl da “solução de parada” e foi realizada a leitura no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450nm. As concentrações de RANKL e OPG foram calculadas a partir de uma curva padrão, fornecida com o kit.

4.7 Análise biomecânica dos fêmures

O teste de flexão em três pontos foi realizado em Máquina de Ensaio Universal (EMIC, INSTRON, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Os fêmures retirados do congelador 12 horas antes do ensaio e mantidos em solução de Ringer em temperatura ambiente até o momento antecedente ao teste.

Para realização do teste de flexão em três pontos, os ossos foram biapoiados, nas regiões metafisárias, sobre dois suportes distanciados 10mm entre si (Figura 6). A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, na região central, a uma velocidade constante de 3mm/minuto até o momento da ruptura do osso. A

célula de carga foi de 100N (Bi et al., 2011) e as seguintes propriedades biomecânicas extrínsecas foram obtidas: força máxima (N), deslocamento (mm), energia (J) e rigidez (N/mm).

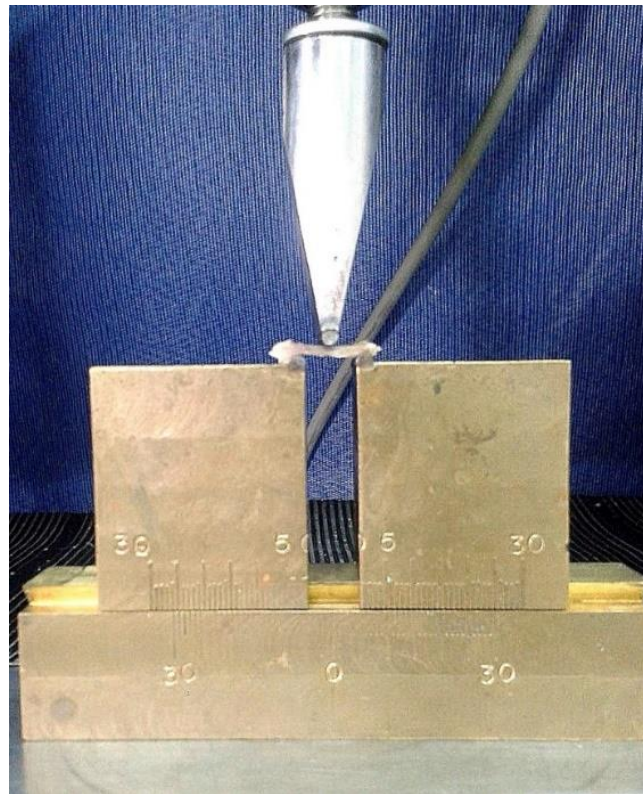


Figura 6 - Fêmur posicionado na Máquina de Ensaio Universal (EMIC) momentos antes do teste de flexão em três pontos.

Após o teste a superfície onde ocorreu a ruptura do osso foi levemente desgastada com um disco de caburundum, de forma que ficasse plana. Foram então obtidos cortes, de secção transversal, de 2mm de espessura dos fêmures, sempre a partir da metade distal do osso. Os cortes foram posicionados sobre uma lâmina de cera 7, de maneira que ficassem paralelos à superfície e foram fotografados em lupa estereoscópica em aumento de 20 vezes.

Utilizando-se o programa ImageJ foram mensuradas a maior e menor distância entre as corticais externas (denominadas B e b,

respectivamente) e a maior e menor distância entre as corticais internas (denominadas D e d, respectivamente) (Figura 7). Combinados os cálculos geométricos e os resultados dos testes biomecânicos, foi calculado o módulo de elasticidade e a tensão máxima de cada osso, segundo as fórmulas (Schiriefer et al., 2005):

$$E = F/D \cdot L^3 / 48I_x; \sigma_u = FU (Lc / 4I_x)$$

Onde: E é o módulo de Young (GPa); F é a força aplicada (N); D é o deslocamento (mm); L é a distância entre os suportes (mm); I_x é o momento de inércia; σ_u é a tensão máxima (MPa); U é a energia na força máxima (mJ); L é a distância entre os apoios (mm); c é a metade do diâmetro do osso (mm).

O momento de inércia foi obtido através da fórmula:

$$I_x = 0,049 \cdot [(B \cdot D^3) - (b \cdot d^3)]$$

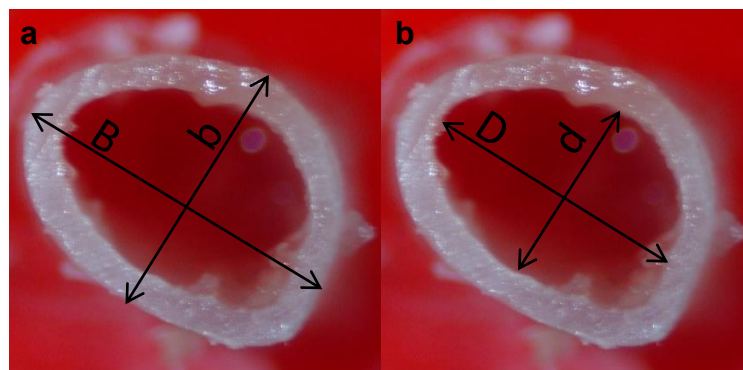


Figura 7 - Secção do fêmur mostrando como foram feitas as medidas das corticais externas (a) e internas (b).

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou de Kruskal-Wallis, dependendo da distribuição dos dados, com nível de significância de 0,05. Em caso de diferença estatística, utilizaram-se os testes pos-hoc de Tukey e Dunn, com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histométrica

Após realização dos testes de normalidade foi feita análise estatística com teste ANOVA para perda óssea linear e Kruskal-Wallis para a região de furca. Tanto para perda óssea linear ($P < 0,0001$; $F = 30,48$) quanto para perda óssea na região de furca ($P = 0,0001$; $H = 20,96$) foi constatada diferença significativa entre os grupos, evidenciando maior perda óssea nos grupos em que a DP foi induzida, comprovando assim a eficácia da indução da doença periodontal pelo método da ligadura. Por outro lado, não foi encontrada diferença significativa entre o grupos que receberam tratamento com os AChEIs e o grupo ligadura (Figuras 9 e 10).

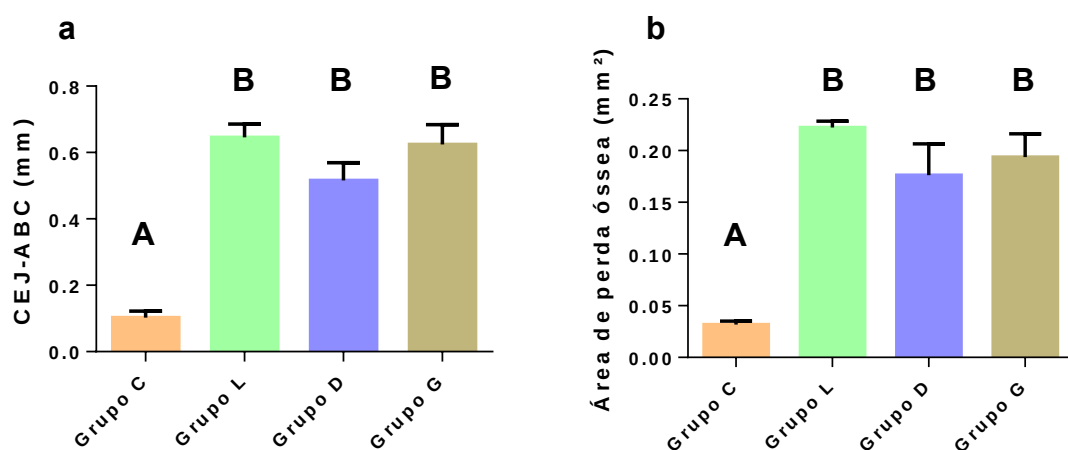


Figura 9 - Gráfico de médias e erros-padrão dos valores de perda óssea alveolar na região distal (a) e de área de perda óssea na região de furca (b). Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatística.

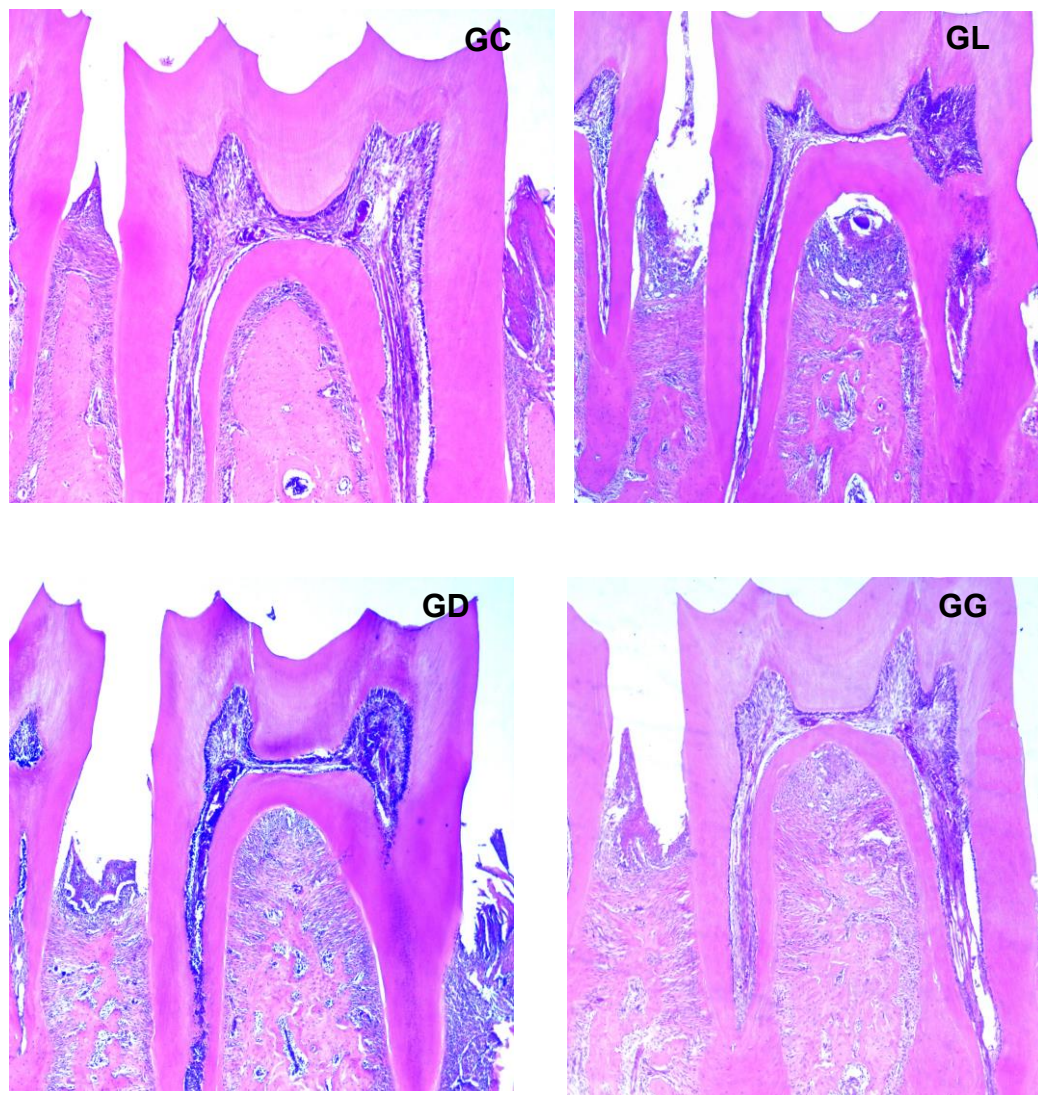


Figura 10 - Fotomicrografias mostrando região de furca e região distal do primeiro molar inferior de um espécime representativo de cada grupo. Nota-se reabsorção da crista óssea alveolar e na região de furca nos grupos C, D e G, enquanto que no grupo C a altura óssea nessas regiões encontra-se preservada. Aumento original de 50x, coloração com hematoxilina e eosina.

5.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após aplicação dos testes de normalidade, foi realizado o teste estatístico ANOVA para RANKL e Kruskal-Wallis para OPG e observou-se que não houve diferença significativa em relação à

concentração sérica de RANKL ($P=0,48$; $F=0,84$) (Figura 11a) e OPG ($P=0,65$; $H=1,64$) (Figura 11b) entre os grupos testados, demonstrando que a administração dos medicamentos no período e doses utilizados não alteraram a concentração sérica desses compostos.

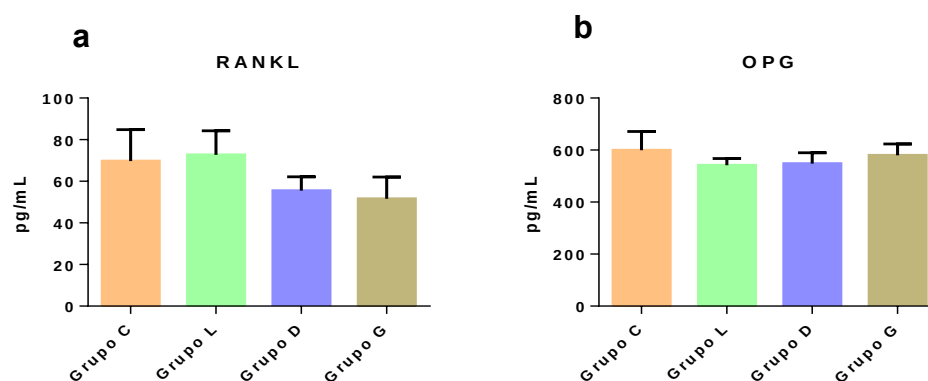


Figura 11 - Gráfico de médias e erros-padrão da concentração sérica de RANKL (a) e OPG (b).

5.3 Análise biomecânica dos fêmures

Os testes biomecânicos, como o teste de flexão em três pontos, são utilizados para medir a fragilidade óssea através da mensuração de propriedades mecânicas do esqueleto.

Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos com relação às propriedades extrínsecas: deslocamento (Kruskal-Wallis; $P=0,69$; $H=1,47$), energia (Kruskal-Wallis; $P=0,23$; $H=4,27$), força máxima (ANOVA; $P=0,83$; $F=0,29$) e rigidez (ANOVA; $P=0,42$; $F=0,98$), obtidas através do ensaio biomecânico (Figura 12), o que também ocorreu quando se avaliaram as propriedades intrínsecas: tensão máxima (Kruskal-Wallis; $P=0,19$; $H=4,79$) e módulo de elasticidade (ANOVA; $P=0,14$; $F=1,96$) (Figura 13).

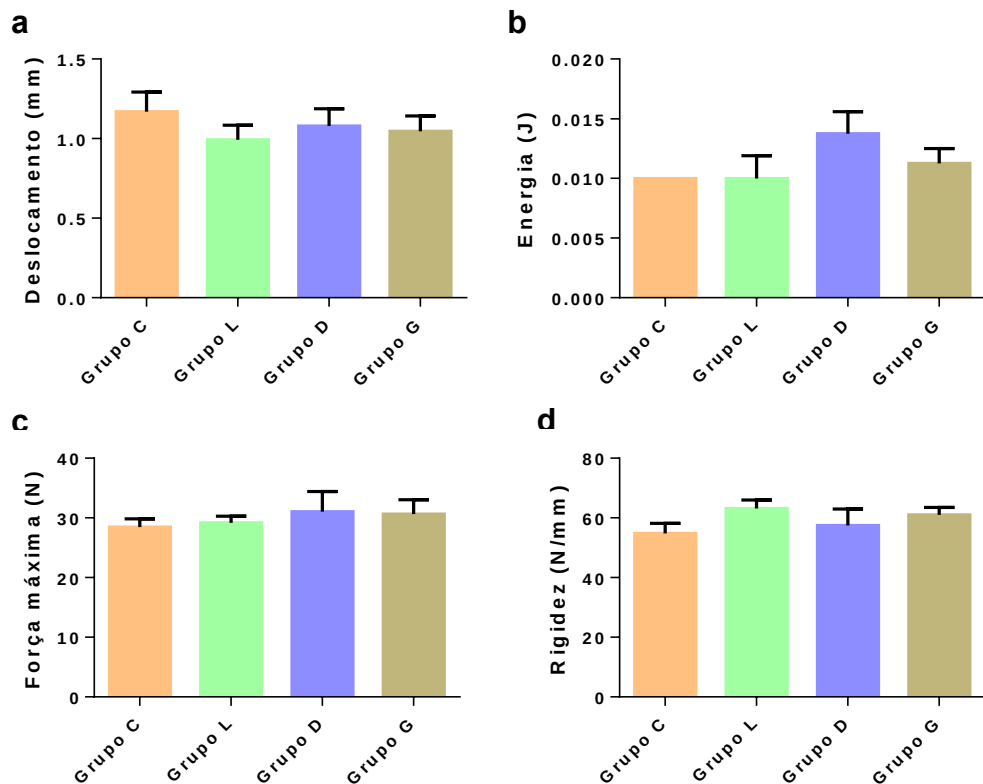


Figura 12 - Gráficos de médias de erros-padrão das propriedades extrínsecas dos fêmures obtidas através do teste biomecânico. a) Deslocamento; b) Energia; c) Força máxima; d) Rigidez.

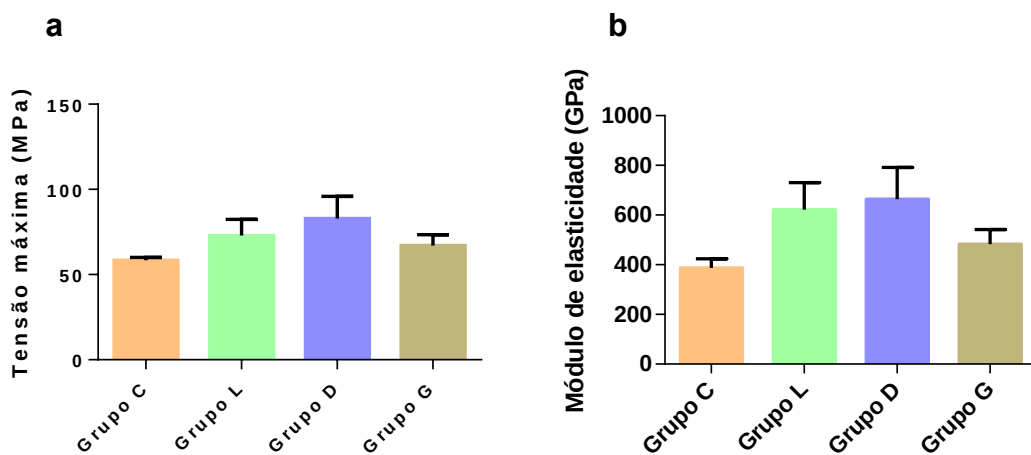


Figura 13 - Gráfico de médias de erros-padrão das propriedades intrínsecas dos fêmures. a) tensão máxima; b) módulo de elasticidade.

6 DISCUSSÃO

A DP é uma doença caracterizada por inflamação, induzida pela colonização do periodonto por bactérias que levam à reabsorção do osso alveolar (di Benedetto et al., 2013). O osso é um tecido que se encontra constantemente em remodelação, que é regulada por diversos fatores, incluindo hormônios, citocinas e fatores mecânicos (Ma et al., 2014). O SNS atua como um regulador negativo de massa óssea. A atividade adrenérgica inibe a proliferação de osteoblastos e promove a osteoclastogênese (Ducy et al., 2000; Eimar et al. 2013a; Elefteriou et al., 2005), enquanto que a atividade colinérgica atua positivamente no controle da massa óssea através da supressão do SNS e promovendo apoptose dos osteoclastos (Bajayo et al., 2012; Shi et al., 2010). Uma vez que o sistema colinérgico não neuronal é expresso nos ossos de maneira geral e que a presença de subunidades dos nAChR e mAChR, principalmente as subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\beta 1$, $\beta 4$ e M2, M3, M4, M5, já foi detectada nos ossos maxilares de ratos (Guo et al., 2014), no presente estudo administramos dois medicamentos, agonistas do SNP, em camundongos com periodontite induzida por ligadura e testamos a hipótese de que nesses animais pudesse haver menor perda óssea quando comparados aos animais controle. Tanto a galantamina quanto o donepezil são fármacos agonistas do SNP, pois bloqueiam a destruição da ACh pela enzima AChE. Tais medicamentos são amplamente comercializados para tratamento dos sintomas da DA leve a moderada, juntamente com a rivastigmina, já que nos pacientes portadores dessa doença os níveis de ACh encontram-se diminuídos nos neurônios colinérgicos (Standridge, 2004). Apesar das ligeiras variações do modo de ação desses três medicamentos, não há nenhuma evidência de qualquer diferença entre eles no que diz respeito à

eficácia (Birks, 2006), porém a galantamina apresenta mais de um mecanismo de ação no sistema colinérgico: inibição da AChE com a modulação alostérica do nAChR e aumento da liberação de ACh (Anand, Singh, 2013).

Alternativamente, os AChEIs tem implicações no tratamento de inflamações graves, resultantes de sepse, endotoxemia e artrite reumatoide, bem como no tratamento de neuroinflamações associadas com a DA e miastenia gravis (Young et al., 2010), uma vez que, a administração desses inibidores pode diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Pavlov et al., 2009).

Utilizamos dois AChEIs em sua forma comercial: Donepezil (cloridrato de donepezila 5mg) na dose de 2mg/kg/dia (Jiang et al., 2013) e Galantamina (Bromidrato de Galantamina - Reminyl® ER 16mg) na dose de 3mg/kg/dia (Yano et al., 2009), que foram administrados por via oral, através de gavagem. Além das referências utilizadas para determinação da dose dos medicamentos, o ajuste da dose para camundongos foi realizado também a partir da dose recomendada para humanos, através da aplicação da fórmula de conversão de doses entre espécies, baseado no estudo de Reagan-Shaw et al. (2007). Além da utilização da fórmula de conversão de doses, baseamo-nos em um estudo preliminar, do grupo de pesquisas em biologia óssea da Universidade de Vanderbilt (Ma et al., 2015) tanto para determinação da dose quanto do tempo de tratamento. Esse estudo avaliou a influência de três inibidores da acetilcolinesterase (donepezil, piridostigmina e galantamina), administrados por via intraperitoneal, sobre a microarquitetura do tecido ósseo de camundongos C57BL6, por um período de 6 semanas (42 dias), obtendo resultados positivos com donepezil e galantamina quando se avaliou a microestrutura óssea. Porém, esses resultados não puderam ser observados no nosso estudo, tanto na avaliação histométrica das mandíbulas quanto na análise biomecânica dos fêmures dos camundongos com periodontite que foram tratados com os AChEIs.

A análise histométrica das mandíbulas demonstrou que o método de indução da DP foi eficaz, mas que não houve diferença estatística significativa dos grupos tratados com relação ao controle. Na literatura ainda não foram publicados estudos que demonstrem a eficácia desses fármacos ou de outros AChEIs na diminuição da reabsorção óssea alveolar causada pela DP. Por outro lado, estudos que utilizaram o propranolol, fármaco antagonista do SNS, em ratos com periodontite induzida, demonstraram que ocorreu menor perda óssea nos grupos testados (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012). Uma vez que o SNP favorece o aumento de massa óssea agindo centralmente ou através da inibição do SNS (Shi et al., 2010), esperávamos resultados parecidos com os desses estudos através da estimulação do SNP pelos AChEIs.

A análise biomecânica através da avaliação de propriedades extrínsecas e intrínsecas do osso não demonstrou melhora da qualidade óssea. Diferentemente dos nossos resultados, estudos tem demonstrado que pacientes com DA que fazem uso contínuo desses medicamentos apresentam melhora da qualidade óssea, com diminuição do risco de fraturas (Tamimi et al., 2012). Por outro lado, Kim et al. (2011), em uma revisão sistemática da literatura relataram que os efeitos diretos dos AChEIs sobre osso de pacientes com DA ainda não são completamente conhecidos.

Uma hipótese que pode ser levantada para explicar o porquê de nossos resultados serem diferentes dos obtidos pelo grupo de pesquisas da Universidade de Vanderbilt é a linhagem de camundongos utilizada, uma vez que existem diferenças significativas na estrutura e remodelação óssea quando consideramos o sexo e a linhagem dos camundongos. Um estudo de Beamer et al. (1996), que avaliou as diferenças de densidade óssea de 12 linhagens diferentes de camundongos a partir dos fêmures, vértebras e falanges proximais, demonstrou que na comparação de parâmetros ósseos entre linhagens puras existem diferenças significativas em cada um dos três locais

investigados, sendo que camundongos C57BL/6J apresentaram os menores valores de densidade cortical, mineral e volume ósseo para qualquer das regiões analisadas. Li et al. (2001) também realizaram um estudo que avaliou o efeito das variações genéticas sobre a remodelação óssea em camundongos. Nesse estudo foram utilizadas 12 linhagens puras de camundongos, demonstrando que houve variação genética significativa na capacidade de regeneração óssea entre as diferentes linhagens. No nosso estudo utilizamos camundongos swiss, que trata-se de uma linhagem híbrida, o que pode ter dificultado ainda mais a obtenção dos resultados esperados.

De maneira geral, os AChEIs são fármacos de uso contínuo e raramente são utilizados em curto prazo, como foi o caso do nosso estudo. Os resultados discrepantes com os do grupo de pesquisas da Universidade de Vanderbilt podem se dever também ao fato de que em nosso estudo utilizamos tanto a forma do fármaco quanto a via de administração diferentes. Enquanto nós utilizamos os medicamentos na sua forma comercial e administramos por via oral, através de gavagem, eles utilizaram somente o princípio ativo que foi administrado por via intraperitoneal. Apesar de ter sido considerada a biodisponibilidade de ambos medicamentos quando administrados por vias diferentes para determinação do cálculo da dose, sabe-se que a administração de drogas por via oral é a mais variável, pois envolve um trajeto mais complicado de acesso aos tecidos e, sendo assim, o metabolismo de primeira passagem no intestino ou no fígado pode limitar a eficácia de muitos fármacos tomados por via oral. Além disso, no estudo de Ma et al. (2015), foi realizada análise microtomográfica para avaliação do osso trabecular das tíbias, enquanto que no nosso estudo analisamos a qualidade do osso cortical dos fêmures através do teste de flexão em três pontos. De maneira geral, alguns medicamentos podem apresentar uma ação diferente no osso trabecular e no osso cortical e, por isso, planejamos realizar a análise

histológica dos fêmures para que possamos também analisar a ação dos AChEs no osso trabecular dos camundongos.

Os AChEs, por meio da inibição da AChE, proporcionam o aumento da ACh disponível e conseqüentemente sua ligação aos seus respectivos receptores (muscarínico e nicotínico). Os nAChRs, em certo ponto, apresentam um papel ambíguo, uma vez que estudos tem demonstrado que a nicotina (agonista exógeno do nAChR) é prejudicial aos tecidos periodontais, aumentando o risco de DP destrutiva (Bergstrom 2004, Heasman et al., 2006). Breivik et al. (2009) demonstraram que em ratos com periodontite induzida o tratamento crônico com nicotina pode aumentar a progressão da DP através da estimulação do nAChR e que o tratamento com mecamilamina (antagonista do nAChR) diminuiu essa progressão. Ao examinar a resposta dos nAChRs, é importante considerar que a sua ação depende da concentração e da taxa de exposição ao agonista. A ACh (principal agonista do nAChR) é liberada a uma concentração de 1mM e é rapidamente hidrolisada pela AChE. Esse pulso rápido resulta na ativação sincronizada dos nAChRs com pouca ou nenhuma dessensibilização, enquanto que a nicotina proveniente do tabaco é liberada lentamente a uma concentração de 1 μ M, ficando em contato por muito mais tempo com os nAChRs, particularmente porque não sofre hidrólise pela AChE. Esse longo tempo de exposição à uma baixa concentração do agonista favorece a dessensibilização ou até mesmo a não ativação dos nAChRs (Dani, De Biasi, 2001).

OPG é um receptor solúvel secretado pelos osteoblastos e outros tipos de células, que se liga competitivamente ao RANKL, expresso principalmente em osteoblastos, impedindo assim que o RANKL se ligue ao RANK na superfície dos osteoclastos (Stern et al., 2007). As citocinas RANK-RANKL-OPG são membros da superfamília TNF e compartilham características de sinalização comuns a muitos de seus membros. A sinalização RANK-RANKL-OPG exerce papel fundamental na homeostase óssea (Walsh, Choi, 2014). Nakamura et al. (2003) demonstraram em que

camundongos com deficiência de OPG, os níveis séricos de RANKL são marcadamente elevados, o que sugere que a concentração sérica de RANKL está rigorosamente regulada pela OPG circulante. Nossos resultados mostraram que os medicamentos nas doses e período utilizados não foram suficientes para alterar os níveis séricos de RANKL e OPG nos grupos tratados, o que concorda com os resultados tanto da análise histométrica quanto do teste biomecânico.

7 CONCLUSÃO

Ao final desse estudo constatamos que a galantamina e o donepezil não influenciaram a perda óssea alveolar em camundongos com DP induzida, suas propriedades biomecânicas dos fêmures e as concentrações séricas de RANKL e OPG.

Sendo assim concluímos que os medicamentos, nas doses e períodos utilizados, não influenciaram a patogênese da DP e a remodelação óssea sistêmica.

7 REFERÊNCIAS*

Aggelopoulos NC, Liebe S, Logothetis NK, Rainer G. Cholinergic control of visual categorization in macaques. *Front Behav Neurosci* 5. 2011 Nov; 73 (5): 1-10. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00073.

Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2013 Apr; 36(4): 375-99. doi: 10.1007/s12272-013-0036-3. Epub 2013 Feb 24.

Arredondo J, Hall L, Ndoye A, Chernyavsky A, Jolkovsky D, Grando S. Muscarinic acetylcholine receptors regulating cell cycle progression are expressed in human gingival keratinocytes. *J Periodontal Res*. 2003 Feb. 38(1): 79-89. Erratum in: *J Periodontol Res*. 2004 Feb; 39 (1): 79.

Bajayo A, Bar A, Denes A, Bachar M, Kram V, Attar-Namdar M et al. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2012 Sep; 109(38): 15455-60. Epub 2012 Sep 4.

Bartold P, Van Dyke T. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000*. 2013 Jun; 62(1): 203-17. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x.

Bataille C, Mauprivez C, Haÿ E, Baroukh B, Brun A, Chaussain C et al. Different sympathetic pathways control the metabolism of distinct bone envelopes. *Bone*. 2012 May; 50(5): 1162-72. doi: 10.1016/j.bone.2012.01.023. Epub 2012 Feb 2.

Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*. 1996 May; 18(5):397-403.

* 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 2013 set; citado em 11 set.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004 Sep; 92(1): 1-8.

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan; (1):CD005593. Review.

Bi X, Patil CA, Lynch CC, Pharr GM, Mahadevan-Jansen A, Nyman JS. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. *J Biomech*. 2011 Jan; 44(2): 297-303. doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.009. Epub 2010 Oct 28.

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

Breivik T, Gundersen Y, Gjermo P, von Horsten S, Opstad PK. Nicotinic acetylcholine receptor activation mediates nicotine-induced enhancement of experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009 Jun; 44(3):297-304. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01223.x.

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

Chenu C, Marenzana M. Sympathetic nervous system and bone remodeling. *Joint Bone Spine*. 2005 Dec; 72(6): 481-3. Epub 2005 Oct 25.

Cicciu M, Matakana G, Signorino F, Brugaletta A, Cicciu A, Bramanti E. Relationship between oral health and its impact on the quality life of Alzheimer's disease patients: a supportive care trial. *Int J Clin Exp Med*. 2013 Sep; 6(9): 766-72.

Cochran L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Ago; 79(8): 1569-76. doi: 10.1902/jop.2008.080233.

Collomp K, Le Panse B, Portier H, Lecoq AM, Jaffre C, Beaupied H et al., Effects of acute salbutamol intake during a Wingate test. *Int J Sports Med*. 2005 Sep; 26(7): 513-7.

Colovic M, Krstic D, Lazarevic-Pati T, Bondzic A, Vasic V. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013 May; 11(3): 315-35. doi: 10.2174/1570159X11311030006.

Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction [review]. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Dec; 70(4):439-46.

Daffner SD, Waugh S, Norman TL, Mukherjee N, France JC. Nicotine Increases Osteoblast Activity of Induced Bone Marrow Stromal Cells in a Dose-Dependent Manner: An in vitro Cell Culture Experiment. *Global Spine J.* 2012 Sep; 2(3):153-8. doi: 10.1055/s-0032-1326946.

de Vries F, Pouwels S, Bracke M, Leufkens HG, Cooper C, Lammers JW et al. Use of beta-2 agonists and risk of hip/femur fracture: a population-based case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2007 Jun; 16(6): 612-9.

Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013 May; 2013; 2013:503754. doi: 10.1155/2013/503754. Epub 2013 May 23.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan; 100(2):197-207

Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function [review]. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006 Jul; 26(3): 219-33.

Eimar H, Perez Lara A, Tamimi I, Márques Sánchez P, Gormaz Talavera I, Tomba F et al. Acetylcholinesterase inhibitors and healing of hip fracture in Alzheimer's disease patients: a retrospective cohort study. *J Musculoskelet & Neuronal Interact.* 2013b Oct; 13(4): 454-63.

Eimar H, Tamimi I, Murshed M, Tamimi F. Cholinergic regulation of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2013a Jun; 13(2): 124-32.

Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif Tissue Int.* 2014 Jan; 94(1): 140-151. doi: 10.1007/s00223-013-9752-4. Epub 2013 Jun 14.

Elefteriou F, Ahn JD, 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. Epub 2005 Feb 20.

Fang L, Fang X, Gou S, Lupp A, Lenhardt I, Sun Y et al. Design, synthesis and biological evaluation of D-ring opened galantamine analogs as multifunctional anti-Alzheimer agents. *Eur J Med Chem.* 2014 Apr; 76: 376-86. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.035. Epub 2014 Feb 14.

Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *J Periodontol.* 2001 Apr; 72(4): 517-25.

Gibbins I. Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis*. 2013 Jul - Sep; 9(3): 169-75. doi: 10.4161/org.25126. Epub 2013 Jun 6

Graves D, Oates T, Andriankaja O, Wada K, Rossa Jr C. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 3. 2011 Jan 17; 3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304.

Guo J, Wang L, Xu H, Che X. Expression of non-neuronal cholinergic system in maxilla of rat in vivo. *Biol Res*. 2014 Dec; 47(1): 72. doi: 10.1186/0717-6287-47-72.

Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence [review]. *J Clin Periodontol*. 2006 Apr; 33(4): 241-53.

He J, Jiang L, Dai L. The roles of the sympathetic nervous system in osteoporotic diseases: a review of experimental and clinical studies. *Ageing Res Rev*. 2011 Apr; 10(2): 253-63. doi: 10.1016/j.arr.2011.01.002. Epub 2011 Jan 22.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009 Sep; 73(10): 768-74. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95.

Jiang Y, Zou Y, Chen S, Zhu C, Wu A, Liu Y et al. The anti-inflammatory effect of donepezil on experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. *Neuropharmacology*. 2013 Oct; 73: 415-24. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.06.023. Epub 2013 Jul 2.

Jin L, K. Chiu G, Corbet E. Are periodontal diseases risk factors for certain systemic disorders--what matters to medical practitioners [review]? *Hong Kong Med J*. 2003 Feb; 9(1): 31-7.

Kamer AR, Craig R, Pirraglia E, Dasanayake A, Norman R, Boylan R et al. TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J Neuroimmunol*. 2009 Nov; 216(1-2): 92-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.08.013. Epub 2009 Sep 19.

Kamer AR, Dasanayake AP, Craig RG, Glodzik-Sobanska L, Bry M, de Leon MJ. Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis [review]. *J Alzheimers Dis*. 2008 May; 13(4): 437-49.

Kim DH, Brown RT, Ding EL, Kiel DP, Berry SD. Dementia medications and risk of falls, syncope, and related adverse events: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc*. 2011 Jun; 59(6):1019-31. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03450.x. Epub 2011 Jun 7.

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. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01177.x. Epub 2009 May 18.

Koide M, Kinugawa S, Takahashi N, Udagawa N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. *Periodontol* 2000. 2010 Oct; 54: 235-246. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00355.x.

Kondo M, Kondo H, Miyazawa K, Goto S, Togari A. Experimental tooth movement-induced osteoclast activation is regulated by sympathetic signaling. *Bone*. 2013 Jan; 52(1): 39-47. doi: 10.1016/j.bone.2012.09.007. Epub 2012 Sep 18.

Liu ZH, Ma YF, Wu JS, Gan JX, Xu SW, Jiang GY. Effect of cholinesterase inhibitor galanthamine on circulating tumor necrosis factor alpha in rats with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Jul; 123(13): 1727-30.

Li X, Gu W, Masinde G, Hamilton-Ulland M, Rundle CH, Mohan S et al. genetic variation in bone-regenerative capacity among inbred strains of mice. *Bone*. 2001 Aug; 29(2):134-40

Marinucci L, Bodo M, Balloni S, Locci P, Baroni T. Sub-toxic nicotine concentrations affect extracellular matrix and growth factor signaling gene expressions in human osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2014 Dec; 229(12):2038-48. doi: 10.1002/jcp.24661.

Martins L. Influência do sistema nervoso simpático na periodontite induzida e em glândula salivar de ratos [dissertação]. ICT Odontologia. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia UNESP - Univ Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho; 2011.

Ma Y, Elefteriou F. Relationship between acetylcholine levels and bone loss in the early stages of Alzheimer disease: a mouse study. In: annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2015. Seattle, Washington, EUA. *Resumos*. *J Bone Miner Res* 28 (suppl 1). <http://www.asbmr.org/education/AbstractDetail?aid=4afd2a28-3df0-4055-b349-fdb3f797dc54>. Acessado em 26 de janeiro de 2016.

Ma Y, Li X, Fu J, Li Y, Gao L, Yang L et al. Acetylcholine affects osteocytic MLO-Y4 cells via acetylcholine receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Mar; 384(1-2): 155-164. doi: 10.1016/j.mce.2014.01.021. Epub 2014 Feb 5.

Meshorer E, Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci*. 2006 Apr; 29(4): 216-24. Epub 2006 Mar 3.

Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H et al. Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology*. 2003 Dec; 144(12):5441-9. Epub 2003 Sep 18.

Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoeye A, Jolkovsky DL, Webber RJ et al. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res*. 2000 Apr; 79(4): 939-49.

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.

Ondicova K, Mravec B. Multilevel interactions between the sympathetic and parasympathetic nervous systems: a minireview. *Endocr Regul*. 2010 Apr; 44(2): 69-75.

Otomo-Corgel J, Pucher J, Rethman M, Reynolds M. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract*. 2012 Sep; 12(3 suppl): 20-8. doi: 10.1016/S1532-3382(12)70006-4.

Palma P, Caetano P, Leite I. Impact of periodontal diseases on health-related quality of life of users of the brazilian unified health system. *Int J Dent*. 2013;2013:150357. doi: 10.1155/2013/150357. Epub 2013 Dec 18.

Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC et al. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2004 Jan; 19(1):19-24.

Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2009 Jan. 23(1): 41-5.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar; 22(3):659-61. Epub 2007 Oct 17.

Rodrigues W, Madeira M, Silva T, Clemente-Napimoga J, Miguel C, Dias-da-Silva V et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012 Apr; 165(7): 2140-51. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x.

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

Schriefer JL, Robling AG, Warden SJ, Fournier AJ, Mason JJ, Turner CH. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. *J Biomech*. 2005 Mar; 38(3):467-75.

Schwartzman RJ. New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med*. 2000 Aug; 343(9): 654-6.

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): 623-29.

Shimizu Y, Hosomichi J, Kaneko S, Shibutani N, Ono T. Effect of sympathetic nervous activity on alveolar bone loss induced by occlusal hypofunction in rats. *Arch Oral Biol*. 2011 Nov; 56(11): 1404-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.05.004. Epub 2011 Jun 12.

Shi Y, Oury F, Yadav VK, Wess J, Liu XS, Guo XE, Murshed M, Gerard K Karse. Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab*. 2010 Mar; 11(3): 231-8. doi: 10.1016/j.cmet.2010.01.005.

Silva-Herdade AS, Saldanha C. Effects of acetylcholine on an animal model of inflammation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013; 53(1-2): 209-16. doi: 10.3233/CH-121646.

Sparks Stein P, Steffen M, Smith C, Jicha G, Ebersole J, Abner et al. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012 May; 8(3): 196-203. doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.006. doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.006.

Standridge JB. Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther*. 2004 May; 26(5): 615-30.

Stern A, Laughlin GA, Bergstrom J, Barrett-Connor E. The sex-specific association of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear

factor *kB* legend with bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Eur J Endocrinol*. 2007 May; 156(5): 555-62.

Tamimi I, Ojea T, Sanchez-Siles J , Rojas F , Martin I, Gormaz I et al. Acetylcholinesterase inhibitors and the risk of hip fracture in Alzheimer's disease patients: a case-control study. *J Bone Miner Res*. 2012 Jul; 27(7): 1518-27. doi: 10.1002/jbmr.1616.

Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014 Oct 20; 5:511. doi: 10.3389/fimmu.2014.00511. eCollection 2014.

Wang XJ, Liu YF, Wang QY, Tsuruoka M, Ohta K, Wu SX et al. Functional expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. *Cell Tissue Res*. 2010 May; 340(2): 347-55. doi: 10.1007/s00441-010-0949-9. Epub 2010 Mar 23.

Wang Y, Ge X, Xu XF, Wang XJ. Acetylcholinesterase inhibitor is a potentially useful therapeutic agent for nicotine-induced periodontal disease. *Med Hypotheses*. 2009 Oct; 73(4): 604-5. doi: 10.1016/j.mehy.2009.05.051. Epub 2009 Jul 21.

Yano K, Koda K, Ago Y, Kobayashi H, Kawasaki T, Takuma K et al. Galantamine improves apomorphine-induced deficits in prepulse inhibition via muscarinic Ach receptors in mice. *Br J Pharmacol*. 2009 Jan; 156(1):173-80. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00037.x.

Young S, K. Fabio, Guillon C, Mohanta P, Halton T, Heck D et al. Peripheral site acetylcholinesterase inhibitors targeting both inflammation and cholinergic dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 May; 20(9): 2987-90. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.02.102. Epub 2010 Mar 3.

Zabrodskii PF, Lim VG, Kuzmin AV. Effects of reversible inhibition of cholinesterase and nicotine on mouse mortality and blood levels of proinflammatory cytokines during the early phase of sepsis. *Bull Exp Biol Med*. 2012 Mar; 152(5): 600-2. English, Russian.

Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, Jin QH et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*. 2002 Aug; 9(8): 790-800.

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



CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 03/2014-CEUA/ICT-CJSC-UNESP, sobre "Influência da neuromodulação parassimpática na patogênese da periodontite em camundongos", sob responsabilidade de **ANA LIA ANBINDER**, tendo como colaboradoras as alunas Juliana Bueno Santana Carvalheiro e Mayara Fortunato Arriel, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 09 de maio de 2014

Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 50(cinquenta) camundongos machos, idade:- 14 semanas – 30 grs aprox.