

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Fabiana Cavallini**

**A influência de dose subantimicrobiana de  
doxiciclina sobre a perda óssea alveolar e a  
inserção conjuntiva em periodontite induzida  
associada à sobrecarga oclusal em ratas**

**Taubaté – SP**

**2006**

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Fabiana Cavallini**

**A influência de dose subantimicrobiana de  
doxiciclina sobre a perda óssea alveolar e a  
inserção conjuntiva em periodontite induzida  
associada à sobrecarga oclusal em ratas**

Dissertação apresentada para obtenção do  
Título de Mestre pelo Programa de Pós-  
graduação em Odontologia do Departamento  
de Odontologia da Universidade de Taubaté.  
Área de Concentração: Periodontia  
Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Hernandes  
Ricardo

**Taubaté – SP**

**2006**

**FABIANA CAVALLINI**

**A INFLUÊNCIA DE DOSE SUBANTIMICROBIANA DE DOXICICLINA SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E A INSERÇÃO CONJUNTIVA EM PERIODONTITE INDUZIDA ASSOCIADA À SOBRECARGA OCLUSAL EM RATAS**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.  
Área de Concentração: Periodontia

Data: Taubaté, 21 de junho de 2006  
Resultado: Aprovada com distinção

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Yasmin Rodarte Carvalho  
Assinatura \_\_\_\_\_

Universidade UNESP

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder  
Assinatura \_\_\_\_\_

Universidade de Taubaté

Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo  
Assinatura \_\_\_\_\_

Universidade de Taubaté

Dedico não apenas essa dissertação, mas todas as minhas conquistas profissionais, aos meus pais, Cyro e Lourdes, que em nenhum momento deixaram de me apoiar.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo, por seu profissionalismo e exemplo como pesquisadora, por ter acreditado na minha capacidade e realização deste estudo, com muita paciência e dedicação como orientadora, que se tornou grande amiga.

Ao Departamento de Odontologia de Taubaté, sob a chefia do Prof. Dr. João Baptista de Lima, pela oportunidade da realização de mais uma etapa na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Antônio Olavo Cardoso Jorge, coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia, pela seriedade na condução do curso.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José dos Campos, em especial Prof. Luiz César de Moraes, responsável pelo departamento de Radiologia, pela disponibilidade na execução das tomadas radiográficas e à Profa. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho, por permitir a utilização do Laboratório de Patologia.

Aos professores Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Profa. Dra. Débora Pallos, e demais professores do Mestrado, pela colaboração e coleguismo.

Ao Prof. Dr. Ulisses Fernando Lodi Salgado, que tem sido meu mestre, por todos esses anos de profissão.

À minha querida amiga Andrea Sallan, pelos momentos de motivação e superação de todos os obstáculos enfrentados na realização deste trabalho.

Ao meu amigo Orlando Magalhães Neto, pela amizade e carinho de todos os momentos.

À minha amiga de profissão Marta do Carmo de Jesus, que em todos esses anos tem acreditado no meu trabalho.

Às minhas queridas amigas Janine Sallan e Viviane Rosa, pela amizade e carinho por todos esses anos.

À minha amiga Profa. Daniela Martins de Souza, pela motivação em todos os momentos.

Aos colegas do mestrado, Maria Cecília Tezelli Bortoline, Sônia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues, Priscilla Campanatti de Almeida Chibebe, Leandro Khuppel Villas Boas, João Batista Fernandes, Marcello Faria Regueira Alves, Arnaud Alves Bezerra Júnior pela amizade e troca de experiências valiosas para a realização deste trabalho.

À técnica do laboratório de Histologia Maria de Fátima Pacheco, pelo ensinamento e dedicação de confecções de lâmina histológica.

À Profa. Marina Buselli, pela paciência e dedicação na revisão deste trabalho.

Às secretárias Adriana Peloggia e Alessandra Borges Serra, pela colaboração e orientação nas questões organizacionais do curso.

A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para a frente.

Soren Kierkegaard

## RESUMO

A doença periodontal é uma alteração inflamatória causada por microrganismos e à influência de fatores de risco. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso sistêmico de dose subantimicrobiana de doxiciclina sobre o suporte ósseo periodontal (SOP) e perda de inserção (PI) em periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal em ratas. Foram utilizadas 25 ratas (Wistar) com peso aproximado de 250 g, divididas em cinco grupos (n=5): GC (controle), GL, com ligadura; GT, com sobrecarga oclusal; GLT, com ligadura e com sobrecarga; GLTD, com ligadura, com sobrecarga e com medicação. A periodontite foi induzida pela instalação de ligadura no primeiro molar inferior por 28 dias. Para a sobrecarga oclusal foi realizado desgaste das superfícies oclusais dos segundos e terceiros molares superiores. Os animais do grupo GLTD receberam doses diárias de 0,14mg de doxiciclina administrada por via oral durante o período de indução. Após o sacrifício, as hemi-mandíbulas direitas foram enviadas para análise radiográfica digital para a avaliação do SOP, e as esquerdas para o processamento histológico para avaliação da PI. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Tukey) ao nível de significância de 5%. Os valores médios para GC ( $55,49 \pm 4,86\%$ ) e GT ( $60,03 \pm 3,37\%$ ) foram equivalentes entre si para o SOP e diferentes de GL ( $46,73 \pm 4,80\%$ ), GLT ( $51,69 \pm 2,84$ ) e GLTD ( $57,76 \pm 4,50\%$ ) ( $p=0,001$ ). Em relação à PI, novamente GC ( $0,11 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) e GT ( $0,12 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ ) foram equivalentes entre si e diferentes de GL ( $0,41 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ), GLT ( $0,58 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ) e GLTD ( $0,54 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ) ( $p=0,0001$ ). Baseados nestes resultados pode-se concluir que a utilização de dose subantimicrobiana de doxiciclina não modulou a perda óssea ou a perda de inserção decorrente da periodontite induzida em ratas associadas à sobrecarga oclusal.

Palavras chave: Dose subantimicrobiana de doxiciclina. Sobrecarga oclusal. Periodontite experimental.



## ABSTRACT

The periodontal disease is an alteration inflammatory caused by microorganism and it is the influence of risk factors. The goal of this study is to evaluate the influence of the systemic usage of subantimicrobial doses of doxycycline on periodontal bony support (SBP) and the loss of insertion (PI) in induced periodontitis associated with occlusal overload in female rats. Twenty-five female rats (Wistar) were used weighing about approximately 250 g each, divided into five groups (n=5): GC (control), without ligature, overload nor medication; GL, with ligature, no overload nor medication; GT, without ligature nor medication, but with overload; GLT, with ligature and, but no medication; GLTD, with ligature, overload and medication. The periodontitis was induced by the installation of ligature on first molar inferior during 28 days. An occlusal surface grinding on the second and third superior molars has been performed for the occlusal overload application. The animals of the GLTD group got daily oral doses of 0,14 mg of doxycycline during the induction period. After their sacrifice, the right hemi-mandibles have been sent to digital radiographic analysis for the SBP evaluation, and the left ones to the histological process for the PI evaluation. The results have been sent to variance analysis (ANOVA, Tukey) to the level of significance of 5%. The average results for GC ( $55,49 \pm 4,86\%$ ) and GT ( $60,03 \pm 3,37\%$ ) were similar for the SBP and different for GL ( $46,73 \pm 4,80\%$ ), GLT ( $51,69 \pm 2,84\%$ ) and GLTD ( $57,76 \pm 4,50\%$ ) ( $p=0,001$ ). Regarding the PI, GC ( $0,11 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) and GT ( $0,12 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ ) were similar again and different from GL ( $0,41 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ), GLT ( $0,58 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ) and GLTD ( $0,54 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ) ( $p=0,0001$ ). Based on this results, we conclude that the usage of subantimicrobial doses of doxycycline did not modulate the bone loss and the bone insertion resulting from the induced periodontitis associated with occlusal overload in female rats.

Keywords: Subantimicrobial dose of doxycycline. Occlusal overload. Experimental periodontitis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais	40
Tabela 2 – Estatística descritiva de SOP (%)	49
Tabela 3 - Resultados das comparações múltipla de Tukey entre os grupos	49
Tabela 4 - Posição dos grupos homogêneos pela análise de Tukey	50
Tabela 5 - Estatística descritiva de PI (mm <sup>2</sup> )	51
Tabela 6 - Resultado de comparações múltiplas de Tukey dos valores médios por grupos experimentais para perda de inserção	51
Tabela 7 - Grupos homogêneos através da análise de Tukey para perda inserção	52

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representativo de SOP para todos os grupos experimentais	50
Gráfico 2 – Valores médios de perda de inserção plotados dos grupos experimentais	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos grupos experimentais	41
Figura 2 – Instalação da ligadura	42
Figura 3 – Desgaste oclusal	43
Figura 4 – Aplicação da dose subantimicrobiana de Doxiciclina	44
Figura 5 – Análise radiográfica	45
Figura 6 – Fórmula para cálculo do SOP	46
Figura 7 – Medida linear	47
Figura 8 – Análise dos grupos sem ligadura	55
<p><b>A</b> fragmento com três molares inferiores do GC com aumento 25x HE, <b>B</b> vista interproximal dos 1° e 2° MI do GC, <b>D</b> dentina, <b>OA</b> osso alveolar, <b>JCE</b> união cimento-esmalte, <b>➤</b> fibras transeptais, <b>←</b> inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; <b>C</b> fragmento com três molares inferiores do GT, aumento com 25x HE; <b>D</b> vista inter proximal dos 1° e 2° MI do GT, <b>D</b> dentina, <b>JCE</b> união cimento-esmalte, <b>➤</b> fibras transeptais, <b>←</b> inserção conjuntiva com aumento 200x HE</p>	
Figura 9 – Análise dos grupos com ligadura	56
<p><b>A</b> fragmento com três molares inferiores do GL com aumento com 25x HE, <b>B</b> vista interproximal do 1° e 2° MI do GL; <b>D</b> dentina, <b>➤</b> fibras transeptais, <b>E</b> epitélio juncional, <b>OA</b> osso alveolar, <b>JCE</b> união cimento-esmalte, <b>←</b> inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; <b>C</b> fragmento com três molares inferiores do GLT; <b>D</b> vista interproximal do 1° e 2° MI do GLT, <b>D</b> dentina, <b>➤</b> fibras transeptais, <b>E</b> epitélio juncional, <b>JCE</b> união cimento-esmalte, <b>←</b> inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; <b>E</b> fragmento com três molares inferiores do GLTD; <b>F</b> vista interproximal do 1° e 2° MI do GLTD; <b>D</b> dentina, <b>➤</b> fibras transeptais, <b>E</b> epitélio juncional, <b>OA</b> osso alveolar, <b>JCE</b> união cimento-esmalte, <b>←</b> inserção conjuntiva com aumento com 200x HE</p>	

## LISTA DE ABREVIACOES

Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CD	Clodronato
CGRP	Peptídeos relacionados ao gene da calcitonina
CMT-1	Tetraciclina quimicamente modificada
DOXY	Doxiciclina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GC	Grupo Controle
GL	Grupo Ligadura
GT	Grupo Trauma
GLT	Grupo Ligadura e trauma
GLTD	Grupo Ligadura, trauma e doxiciclina
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória
IL-1	Interleucina1
LPS	Lipopolisacarídeos
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
mRNAs	Síntese de mensageiro de ribonúcleico
NCI	Nível clínico de inserção
PI	Perda de inserção
P S	Profundidade de sondagem
PgE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI	Grupo Porphyromonas gingivalis

SDD	Dose subantimicrobiana de doxiciclina
SDF	Subdose de ibuprofeno
SOP	Suporte ósseo periodontal
TIMPS	Inibidores teciduais endógenos
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
Zn <sup>2+</sup>	Íons zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	19
2.1 Patogênese da Doença Periodontal	19
2.2 Fatores predisponentes da Doença Periodontal	21
2.3 Carga oclusal e Doença Periodontal	25
2.4 Dose subantimicrobiana de Doxiciclina	29
2.5 Periodontite experimental	36
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	40
4.1 Animais	40
4.2 Anestesia	41
4.3 Indução da periodontite	42
4.4 Aplicação de sobrecarga oclusal	43
4.5 Tratamento	43
4.6 Sacrifício	44
4.7 Análise radiográfica	45
4.8 Análise histológica	46
4.9 Análise estatística	47
<b>5 RESULTADOS</b>	49
5.1 Análise radiográfica	49
5.2 Análise histomorfométrica	51
5.3 Análise histológica descritiva	54
<b>6 DISCUSSÃO</b>	57

<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>68</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma alteração inflamatória causada por aumento de colonização de microrganismos periodontopatogênicos. Embora estes patógenos sejam necessários para causar a doença, a degradação dos tecidos periodontais é uma consequência da interação entre o parasita e o hospedeiro.

O hospedeiro, frente à agressão microbiana, por meio das células da resposta imune celular e humoral, secreta mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandina E<sub>2</sub> (PgE<sub>2</sub>), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que são capazes de induzir reabsorção óssea, característica da doença periodontal.

Alguns estudos têm sido direcionados para a identificação dos fatores ambientais e do hospedeiro que estão envolvidos no início e na progressão da doença tais como: fumo, trauma oclusal, diabetes, entre outros (KINANE, 2001; NOCITI JÚNIOR et al., 2000). Dentre os fatores do hospedeiro, a presença de trauma oclusal é associada a um aumento na perda óssea alveolar. Estudos que avaliaram o trauma oclusal de forma isolada, sem doença periodontal, demonstraram que as alterações ósseas apresentavam-se como reversíveis após a remoção deste fator (CARRANZA, 2004).

O periodonto é uma unidade biológica e funcionalmente bem definida e adaptada, principalmente, a resistir e se acomodar às pressões mastigatórias. O tecido conjuntivo do ligamento periodontal é mais denso e consistente quando comparado com o tecido conjuntivo pulpar. As fibras de Sharpey partem das proximais da lâmina dura e se inserem no cimento. Estas fibras apresentam disposições anatômicas diferentes para se adaptarem a diferentes movimentos dos

dentos. Grande quantidade de fibras colágenas está distribuída em todas as áreas do ligamento periodontal para manter a estabilidade e a ancoragem dos dentes no osso alveolar, para amortecer os contatos mastigatórios, os contatos oclusais que ocorrem durante a deglutição e os que se originam de atividade bruxística. O ligamento periodontal tem então importante função na homeostasia dos tecidos do periodonto de sustentação. A ocorrência de sobrecarga oclusal pode interferir no equilíbrio das funções de homeostasia do ligamento periodontal e conseqüentemente gerar um aumento na reabsorção óssea alveolar para que ocorra uma adaptação destas estruturas sem que se altere a inserção conjuntiva das fibras do ligamento. Porém, dentro dos eventos da patogenia periodontal, a associação desta condição local à ocorrência de processo inflamatório pode alterar de forma irreversível as estruturas do periodonto, gerando a desinserção de fibras colágenas e o aprofundamento do sulco gengival (CARRANZA, 2004).

A doxiciclina aplicada em doses subantimicrobiana tem demonstrado sua ação anticolagenolítica. Este medicamento tem sido utilizado em doenças crônicas como artrite, com protocolo de longos períodos de prescrição. Da mesma forma, a utilização deste medicamento na modulação da perda óssea, decorrente da doença periodontal, tem sido alvo de alguns estudos (BEZERRA et al., 2000; PRESHAW et al., 2004).

A utilização de modelos animais, especialmente ratos, permite a realização de avaliações sensíveis e diferenciadas, com o controle de algumas variáveis sobre a influência de determinado fator de risco, acompanhando o início e a evolução da doença periodontal.

Desta forma, a avaliação da possível influência do uso de dose subantimicrobiana de doxiciclina com o objetivo de modulação da perda óssea

alveolar em periodontite associada à presença de sobrecarga oclusal pode ser relevante.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Patogênese da Doença Periodontal

A doença periodontal apresenta uma evolução histopatológica característica e peculiar. Este processo se inicia a partir de uma infecção microbiana por patógenos com diferentes graus de virulência. Em resposta a esta agressão, o hospedeiro inicia um processo inflamatório que se manifesta pela resposta celular e humoral no combate a este agressor. É a interação entre a agressão microbiana e a resposta do hospedeiro a principal responsável pela degradação tecidual que se manifesta na doença periodontal. A destruição de proteínas constituintes dos tecidos periodontais pode ocorrer de forma direta, quando causada por enzimas provenientes dos microrganismos ou indireta quando causada por enzimas produzidas pelo próprio hospedeiro. A degradação das estruturas periodontais se inicia próximo ao sulco gengival envolvendo apenas periodonto de proteção. No entanto, a continuidade deste processo leva à degradação das estruturas do periodonto de sustentação, caracterizando-se pela reabsorção óssea, perda de inserção conjuntiva e aprofundamento do sulco gengival (CARRANZA, 2004).

No processo biológico de degradação tecidual, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) são de fundamental importância, sendo produzidas por células residentes ou do infiltrado inflamatório, presentes em todos os tecidos periodontais. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de moléculas da matriz extracelular como colágeno, elastina, desempenhando uma etapa crucial na

degradação do tecido conjuntivo e na reabsorção óssea. São sintetizados em uma forma inativa e ativados no meio extracelular, sendo esta ativação controlada por inibidores teciduais endógenos (TIMP) ou por inibidores sintéticos como os agentes quelantes, por exemplo, o EDTA ou análogos da tetraciclina. O papel destas enzimas na patogênese parece depender do equilíbrio da enzima e do inibidor local (RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996).

Paquette e Williams (2000) comentam que o conceito de tratamento periodontal para a doença periodontal, foi baseado na compreensão de que os microorganismos e seus produtos estão primeiramente ligados à destruição dos tecidos periodontais. Este conceito mudou quando pesquisas demonstraram não só o papel dos patógenos, bem como, o papel dos mediadores de inflamação, que por sua vez, estão envolvidos na destruição local do periodonto inflamado. Isto é percebido clinicamente, por exemplo, na perda óssea alveolar.

O fator etiológico da inflamação gengival é o biofilme dental. Associado a este fator, podemos encontrar outros fatores de risco que podem interferir na instalação, desenvolvimento e prognóstico desta doença. Entre estes fatores, podemos citar algumas doenças sistêmicas (diabetes), fatores locais como má-oclusão, (alinhamento irregular dos dentes), fumo, trauma oclusal entre outros (HINRICHS, 2004).

Eickholz et al. (2004) realizaram um estudo comparando dois métodos de avaliação radiográfica de defeitos infra-ósseos quanto à sua morfologia e ao prognóstico destes defeitos após terapia de regeneração tecidual guiada. Foram avaliadas radiografias de cinquenta defeitos ósseos antes do procedimento cirúrgico e, três e seis meses após a cirurgia. Uma das técnicas considerava a distância linear entre a crista óssea e a união cimento esmalte observada na radiografia (Técnica 1)

e a outra avaliava a angulação formada entre a superfície radicular na extensão descrita anteriormente a uma projeção da parede do defeito ósseo (Técnica 2). Os autores compararam o valor preditivo destas técnicas para o estabelecimento de prognósticos 24 meses após a cirurgia. Juntamente com as avaliações radiográficas foram anotados os parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, índice de placa e índice gengival. Os resultados mostraram que a Técnica 2 apresentou melhor valor preditivo quanto ao preenchimento ósseo do defeito após 24 meses. Os autores concluíram que referências anatômicas, como a união cimento-esmalte e a crista óssea, podem ser consideradas na avaliação radiográfica como referenciais de perda óssea, porém as avaliações da angulação formada pelas paredes do defeito podem atuar com melhor valor preditivo para o preenchimento ósseo após cirurgia de regeneração tecidual guiada.

## 2.2 Fatores predisponentes a Doença Periodontal

Sabe-se que um número de fatores predisponentes deve interagir com o sistema de defesa do hospedeiro e tornar o paciente suscetível à doença periodontal.

Nociti Júnior et al. (2000) investigaram as possíveis influências da nicotina na perda óssea na região de furca devido à indução de periodontite por ligadura em ratos. Foram incluídos vinte machos adultos de ratos (Wistar). Após a anestesia, o

dente foi aleatoriamente designado para receber a ligadura de algodão na área sulcular, enquanto os dentes contra laterais permaneceram sem ligadura. Foram utilizadas injeções intraperitoneais diárias e os animais foram designados para um dos seguintes tratamentos: grupo A, 2 µl/g de peso corporal de solução salina; grupo B, 2 µl/g de peso corporal de solução de nicotina com 0,13 µl de nicotina/ ml de solução salina; grupo C, 2 µl/g de peso corporal de solução de nicotina com 0,19 µl de nicotina/ ml de solução salina; e grupo D, 2 µl/ g de peso corporal de solução de nicotina com 0,26 µl de solução de nicotina/ ml de solução salina. Após trinta dias do experimento, os animais foram sacrificados e as peças obtidas foram processadas. As análises intergrupos revelaram maior perda óssea nos dentes com as ligaduras do grupo B ( $1,01 \pm 0,61 \text{ mm}^2$ ), grupo C ( $1,14 \pm 0,72 \text{ mm}^2$ ), e grupo D ( $1,36 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ ) quando comparados com grupo A ( $0,64 \pm 0,62 \text{ mm}^2$ ) ( $p < 0,01$ ). Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa na perda óssea foi encontrada no meio dos grupos B, C e D. Além disso, nenhuma perda óssea foi observada para dentes não induzidos ( $p > 0,01$ ). Os autores concluíram que, dentro dos limites do estudo a nicotina acentuou os efeitos dos fatores desencadeantes da doença periodontal de maneira dose não dependente. Entretanto, a administração de nicotina não produziu perda óssea periodontal por si só.

Segundo Benatti et al. (2003), a nicotina e o estress estão diretamente ligados ao desenvolvimento da doença periodontal como fatores de risco. Neste estudo foi investigado o efeito de estresse associado à indução de periodontite com administração de nicotina em ratos. Foram utilizados vinte animais (ratos Wistar), com indução de periodontite por meio de ligadura inserida no primeiro molar inferior. Os animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais; grupo A recebia solução salina, grupo B recebia 0,73 mg de nicotina diária, grupo C indução de

estresse (ficavam imobilizados durante duas horas / dia) mais solução salina, grupo D recebia 0,73 mg de nicotina mais a indução do estresse. Após quarenta dias, foram sacrificados e as peças obtidas foram encaminhadas para análise histológica. Para avaliação do efeito do estresse e da nicotina, os autores mensuraram a perda óssea na região de bifurcação dos primeiros molares inferiores, por meio de utilização de um programa de leitura de imagens que quantificou o volume ósseo nesta região. Os resultados mostraram perda óssea significativa nos animais do grupo D ( $0,50 \pm 0,45\%$ ), quando comparado ao grupo C ( $0,15 \pm 0,09\%$ ), ao grupo B ( $0,23 \pm 0,09\%$ ) e ao grupo A ( $0,13 \pm 0,04\%$ ). Entre os grupos A, B e C não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Os autores concluíram que o estresse e a nicotina por si só não são capazes de atuar como fator de risco para doença periodontal, podendo estar associados à doença ou má higiene oral.

Nociti Júnior et al. (2001) investigaram os efeitos da administração da nicotina em doença periodontal experimental em ratos. Foram utilizados vinte ratos machos adultos nos quais a periodontite foi induzida através de ligadura no primeiro molar inferior. Após sete dias do começo do experimento, os animais foram divididos em grupos nos quais receberam dose injetáveis para a avaliação (grupo A controle, grupo B recebeu dose 0,37 mg/kg de nicotina, grupo C dose de 0,57 mg/kg de nicotina, grupo D dose de 0,73 mg/kg de nicotina) após trinta dias foram sacrificados. As mandíbulas foram removidas e fixadas com 4% de formalina neutra por 48 horas, avaliados através da análise histométrica (descalcificado por 50% de ácido fórmico e 20% de ácido cítrico por 45 dias). Os autores observaram que o aumento na dose de nicotina aplicada gerou um aumento na destruição dos tecidos periodontais em uma forma dose dependente.



Gaspersic et al. (2003) fizeram um estudo com objetivo de avaliar os efeitos da ligadura (indução da periodontite) e do estresse (isolamento) em ratas. Foram utilizadas trinta ratas da raça Wistar, com peso médio de 200 g. A ligadura foi posicionada ao redor do segundo molar superior direito, onde foi mantida por quatro semanas. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de dez animais cada. Para indução do estresse foram colocados dois animais em um recipiente de tamanho reduzido, com a impossibilidade de movimentos (estimulação do estresse). O grupo G1 foi exposto ao estresse, por 12 horas (20 h até as 8 h), G2 exposto por 2 h 30 min (20 h até as 22 h 30 min), G3 foi o grupo controle. A avaliação do peso corporal de cada animal que inicialmente era similar, após o experimento demonstrou que apenas o grupo G3 que não sofreu nenhum tipo de estresse teve ganho de peso. Após o período de indução foi feito o sacrifício dos animais e preparados para análise morfométrica, usando microscopia de luz. Os resultados demonstraram que houve uma diferença estatística significativa em relação ao peso dos animais submetidos ao estresse, a reação inflamatória era mais nítida no lado onde foi instalada a ligadura pronunciada vaso dilatação e caracterizando um processo inflamatório crônico. Os autores concluíram que o estresse por si só não resulta em doença periodontal, mas pode modular os processos inflamatórios da inflamação periodontal já instalada, resultando na aceleração do processo de destruição dos tecidos periodontais.

### 2.3 Carga oclusal e doença periodontal

Alterações na estrutura de suporte e proteção, bem como o aumento de mobilidade dental, podem ser detectadas clínica e radiograficamente. O aumento do espaço do ligamento periodontal, o aumento da espessura da lâmina dura e a intensificação do trabéculado óssea são manifestações do aumento da carga oclusal que podem ser observadas radiograficamente. Estas adaptações teciduais são observadas na ausência do processo inflamatório na busca do equilíbrio entre eventos que levam a neo-formação e reabsorção óssea. Clinicamente este quadro se manifesta pelo aumento da mobilidade dental sem que ocorra um aprofundamento do sulco gengival. Este quadro clínico é possível de ser revertido na medida em que se estabelece um equilíbrio entre as cargas de compressão e tensão (LINDHE; NYMAN; ERICSSON, 1999).

Num estudo avaliando a reabsorção óssea e a reabsorção radicular, Lu et al. (1999) realizaram um experimento em que era aplicada força intrusiva em molares de ratos. Foram utilizados 38 animais, sendo fixado um dispositivo ajustado para a aplicação de força intrusiva de 50 g em um dos primeiros molares superiores, permanecendo o contra lateral como controle, mantido por um período de sete, 14 e 21 dias. A reabsorção óssea e radicular foi avaliada histometricamente na região apical e na bifurcação radicular em cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina e a atividade de reabsorção foi avaliada pela quantificação de células marcadas para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Os resultados mostraram níveis mais elevados de células TRAP+ nas regiões inter-radulares que nas periapicais, principalmente nas segunda e terceira semanas. As células TRAP+

estavam mais relacionadas à superfície óssea que à superfície radicular. Já a reabsorção radicular observada foi maior na região apical. Baseados nestes resultados os autores sugerem que a reabsorção óssea mais evidente na região periapical pode ocorrer independentemente dos níveis de células TRAP+ considerando que o cemento celular presente nesta região apresente maior componente orgânico e menor componente mineral.

A sobrecarga oclusal aplicada em estruturas periodontais na presença de inflamação gera alterações com características de irreversibilidade. O desequilíbrio entre as forças de tensão e compressão é associado à reabsorção óssea decorrente do processo inflamatório. Como consequência, a degradação das fibras colágenas do ligamento leva à perda de inserção conjuntiva.

Nunn e Harrel (2001) realizaram um estudo retrospectivo para avaliar a associação de discrepância oclusal e doença periodontal em indivíduos tratados em clínica privada. Participaram deste estudo indivíduos que tivessem seu prontuário periodontal com todas as anotações incluindo análise de oclusão durante um ano. Os indivíduos que preenchessem estes critérios foram divididos em: grupo não tratado (trinta), nos quais nenhum tratamento periodontal foi proposto; grupo parcialmente tratado (18), nos quais foi realizada apenas a raspagem; grupo totalmente tratado (41), nos quais todos os tratamentos recomendados, inclusive tratamento cirúrgico foi concluído. Os dados referentes a cada dente e a cada paciente foram inseridos em uma base de dados e analisados para testar a associação entre discrepância oclusal inicial e vários parâmetros clínicos periodontais iniciais. Os resultados mostraram que as discrepâncias oclusais iniciais estavam significativamente associadas a bolsas periodontais mais profundas. Também foi observada associação entre a discrepância oclusal inicial em indivíduos

com boa higiene oral. Quando os dados foram ajustados para fatores de risco conhecido como fumo e higiene oral deficiente os resultados também demonstraram que a discrepância oclusal estava associada a doença periodontal. Os resultados observados levaram os autores a concluir que existe uma forte associação entre discrepância oclusal inicial e vários parâmetros clínicos relevantes para diagnóstico e prognóstico da doença periodontal.

Harrel e Nunn (2001) descreveram que o efeito da discrepância oclusal na evolução do tratamento da doença periodontal tem algumas controvérsias. O trauma e a oclusão são considerados fatores primários para progressão da doença periodontal; o ajuste oclusal é considerado no tratamento periodontal. Foi feito estudo em uma clínica privada, com 89 pacientes sendo todos incluídos em um critério de exclusão, com periodontite crônica severa, no período de um ano. Foram divididos em grupos; sem tratamento recomendado (trinta); tratados periodontalmente, mas sem atos cirúrgicos (18); tratamento periodontal completo com atos cirúrgicos (41) considerado controle. Foi analisado através de métodos comparativos entre os critérios: idade, gênero, higiene oral, fumantes, hábitos para-funcionais, história médica, diabetes, discrepância oclusal. Os resultados demonstraram que 60% dos dentes inicialmente sem presença de discrepância oclusal apresentaram mobilidade comparados aos que não receberam tratamentos em relação à discrepância oclusal, e que 40% dos dentes inicialmente sem presença de discrepância oclusal apresentaram mobilidade em relação aos dentes que receberam tratamento de ajuste oclusal. A diferença entre grupos foi pouco significativa em relação à discrepância oclusal e a progressão da doença periodontal.

Harrel (2003), em uma revisão de literatura, descreveu a dificuldade na realização de estudo em humanos para se investigar a influência das forças oclusais sobre a progressão da doença periodontal. O autor comenta que a maioria dos estudos sobre discrepância oclusal e doença periodontal são estudos retrospectivos. Os resultados observados nos estudos revisados pelo autor demonstraram que dentes que apresentaram discrepância oclusal e mobilidade estavam associados com maiores profundidades de sondagem e maiores perdas de inserção. Desta forma, o autor concluiu que a interferência oclusal tem um efeito negativo sobre o periodonto e tende a aumentar a velocidade da formação da bolsa periodontal e piorar o prognóstico destes casos quando comparados a dentes que não estão expostos a interferências oclusais. O autor conclui que na presença de interferência oclusal sem doença periodontal a terapia pode se restringir à remoção desta interferência. Porém, quando a doença periodontal for associada à interferência oclusal a terapia deve abranger, além dos procedimentos periodontais de rotina, o ajuste oclusal que elimine esta interferência.

Nogueira-Filho et al. (2004) investigaram o efeito da nicotina na perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida associada a trauma oclusal. Neste estudo, foram analisados trinta animais nos quais era aplicada ligadura em um dos primeiros molares de cada arco, sendo o dente contra lateral considerado como controle. Nos animais em que seria aplicada a sobrecarga oclusal foram desgastados os segundos e terceiros molares permanecendo o contato apenas entre os primeiros molares. Os animais foram divididos em: grupos A, recebia 0,44 mg/kg de solução de nicotina e trauma oclusal (dez); grupo B, trauma oclusal (dez); grupo C, solução salina como controle (dez). Após trinta dias os animais foram sacrificados e as peças cirúrgicas foram descalcificadas em EDTA 10%, e

processadas para a coloração com hematoxilina e eosina. Os autores utilizaram um programa de leitura de imagem para avaliar a perda óssea na região da bifurcação radicular considerando a área ocupada entre a crista óssea inter-radicular e o cimento radicular. Essa característica foi mensurada em cinco cortes por espécime e os valores médios expressos em  $\text{mm}^2$  permitiram uma análise intra-grupos e inter-grupos. Os resultados mostraram perda óssea significativamente maior para o grupo A quando comparados os dentes que receberam só ligadura. Na comparação dos dentes contra laterais, a perda óssea foi equivalente entre os grupos A e B e maiores que o grupo C. Os autores concluíram que a nicotina influencia a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida e associada à sobrecarga oclusal.

#### 2.4 Dose subantimicrobiana de Doxíciclina

A terapia periodontal de rotina baseia-se no controle mecânico do biofilme dental por meio dos recursos de escovação dentária, da limpeza interdentária e da raspagem e aplainamento radiculares com ou sem acesso cirúrgico. Algumas alternativas podem complementar estes procedimentos como o controle químico do biofilme dental ou a utilização de medicamentos que apresentam a propriedade de modulação da resposta do hospedeiro.

As tetraciclinas compreendem uma família de medicamentos que, além de sua ação antibiótica, apresentam o potencial de inibir a ação de MMP derivadas do hospedeiro e, portanto, apresentam um grande potencial de aplicação como terapia adjunta à terapia mecânica para a resolução da doença periodontal. Estas

substâncias têm a capacidade de fixar íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  e, desta forma promover uma inibição direta da atividade das MMP. Este medicamento pode ainda inibir a conversão de pró - MMP em MMP ativa, na matriz extracelular (RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996). Dentre as tetraciclinas a doxiciclina é o medicamento que apresenta esta propriedade com maior aplicabilidade clínica para a inibição das collagenases. Este medicamento apresenta concentrações mínimas inibitórias ( $\text{IC}_{50} = 15\mu\text{M}$ ) menores que as minociclinas ( $\text{IC}_{50} = 190\mu\text{M}$ ) ou que as tetraciclinas ( $\text{IC}_{50} = 350\mu\text{M}$ ) indicando que seria necessária uma dose muito menor deste medicamento para inibir em 50% os níveis de collagenase de um determinado sítio quando comparadas com as doses necessárias de minociclinas ou tetraciclina. Além disso as CMT modula a resposta do hospedeiro, a inibição da formação de radicais oxigenados derivados de neutrófilos, a regulação da expressão de mediadores pró inflamatórios e citocinas, o aumento da produção de colágeno, a ativação dos osteoblastos e da formação óssea (PRESHAW et al., 2004).

A habilidade da doxiciclina em controlar a atividade da collagenase tem apontado para um novo protocolo de terapia periodontal. Preshaw et al. (2004) comentaram que a utilização de dose subantimicrobiana de doxiciclina (20 mg/2xdia) por um período prolongado, associado à terapia periodontal, tem demonstrado melhora nos parâmetros clínicos sem que se evidenciasse a ocorrência de espécies resistentes à tetraciclina ou a outros antibióticos.

Karimbux et al. (1998) estudaram os efeitos da periodontite na expressão de colágeno tipos I e XII e investigaram os efeitos da tetraciclina quimicamente modificados e da doxiciclina na expressão dessas moléculas em modelo de periodontite induzida. O Colágeno tipo I é o maior componente do tecido conjuntivo gengival e do ligamento periodontal e o colágeno tipo XII tem sido encontrado em

formas maduras desses tecidos. A remodelação de tecido é um estado dinâmico o qual alcança a homeostase entre a quebra proteolítica e síntese da matriz extracelular. A periodontite experimental em ratos (Sprague-Dawley fêmeas adultas) foi induzida através das bactérias do tipo *Porphyromonas gingivalis* de humanos. Os animais com periodontite induzida por *P. gingivalis* foram subdivididos em grupos: Grupo PGI servindo como controle, infectados e não tratados; Grupo DOXY foi tratado com doxiciclina; e Grupo CMT-1 foi tratado com tetraciclina-1 quimicamente modificada. Grupo NIC contendo animais infectados que serviram de controles. A expressão do mRNAs para o colágeno tipo I e XII foi examinada pela hibridização em cada grupo, com a co-expressão destas moléculas representando tecido gengival conjuntivo desenvolvido (maduro) e funcional. No grupo NIC, a expressão de colágenos  $\alpha 2(I)$  ou  $\alpha 1(XII)$  foi encontrada distribuída uniformemente através do tecido conjuntivo periodontal. O grupo PGI mostrou pequena hibridização nas áreas de infecção, enquanto ambos os grupos DOXY e CMT-1 mostraram co-expressão de amostras  $\alpha 2(I)$  e  $\alpha 1(XII)$  no tecido conjuntivo gengival e parte coronal do ligamento periodontal. Este estudo demonstra que doxiciclina e CMT-1 moderam ou reduzem os efeitos inibitórios da infecção periodontal na expressão do mRNAs para colágeno tipo I e tipo XII. Estes resultados sugerem que doxiciclina pode reduzir a destruição periodontal pela reversão do efeito inibitório da infecção periodontal na síntese do colágeno.

Ashley (1999) realizou um estudo com novas estratégias, com o objetivo de analisar a ação de bactérias e ao mesmo tempo modular a resposta do hospedeiro, responsáveis pela destruição dos tecidos do periodonto, controlando a ação destrutiva da doença periodontal. Neste estudo, os autores avaliaram o tratamento com dose subantimicrobiana de doxiciclina como inibidor das MMP na doença



periodontal em humanos. Foram utilizados 437 indivíduos com periodontite os quais receberam orientação de higiene oral e foram submetidos à profilaxia, que receberam aleatoriamente doxiciclina ou placebo durante 12 semanas. Os indivíduos foram avaliados segundo parâmetros clínicos, radiográficos e segundo a atividade enzimática da collagenase no fluido gengival. As avaliações foram repetidas no período de dois, quatro, oito e 12 semanas visando analisar a redução da atividade de collagenase no sulco gengival e a mudança em relação aos níveis de inserção. Todos os grupos tratados após quatro semanas apresentaram redução de atividade collagenase no sulco gengival. A doxiciclina, quando associada ao tratamento clínico mecânico, mostrou reduzir os níveis de collagenase no sulco gengival mantendo os níveis de inserção clínica e reduzindo o sangramento à sondagem associado à diminuição na perda óssea alveolar.

Caton et al. (2000) realizaram um estudo multicentro, duplo-cego controlado por placebo para a verificação da eficácia e segurança do uso de dose subantimicrobiana de doxiciclina (SDD) associada à raspagem e aplainamento radicular na melhora dos parâmetros clínicos em pacientes com periodontite do adulto. Participaram deste estudo 190 indivíduos, que receberam a terapia periodontal associado à prescrição de 20 mg de doxiciclina duas vezes ao dia por nove meses. Os parâmetros clínicos avaliados no exame inicial e a cada três meses foram o nível clínico de inserção (NCI) e a profundidade de sondagem (PS). Os indivíduos foram estratificados segundo a gravidade da doença no exame inicial baseando-se nos valores de perda de inserção. Os autores também avaliaram a segurança deste protocolo com relação à ocorrência de espécies resistente a doxiciclina e a outros antibióticos. Observou-se melhora significativa nos parâmetros clínicos nos indivíduos tratados com SDD na avaliação após três, seis e nove meses

e que, esta melhora foi mais evidente aos nove meses em indivíduos que apresentaram maior perda de inserção no exame inicial. Não foi observada resistência bacteriana à doxiciclina ou à outros antibióticos nem houve modificação na microbiota periodontal normal. Os autores concluíram que este protocolo apresentou-se eficaz e seguro, representando assim uma nova opção para o monitoramento longitudinal de indivíduos com periodontite do adulto.

Bezerra et al. (2002) utilizaram trinta ratos (Wistar), que receberam dose subantimicrobiana de doxiciclina com objetivo de inibir a perda óssea alveolar induzida por periodontite em molares superiores. Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo que três deles receberam diferentes doses de doxiciclina (2.5, 5 e 10 mg/kg) associada à indução de doença periodontal por ligadura, outro apenas com a indução e outro como controle. Após sete dias de experimento os animais foram sacrificados e as peças cirúrgicas foram processadas para avaliação histológica e macroscópica para mensuração da perda óssea alveolar. A avaliação histométrica quantificou o número de osteoclastos, intensidade do infiltrado inflamatório e a integridade do processo alveolar e cemento radicular. Os resultados demonstraram uma inibição da reabsorção óssea nos animais tratados com doxiciclina de maneira dose dependente. Além disso, foi observado que o grupo controle teve perda óssea alveolar significativa e aumento do número de osteoclastos. Esses dados mostram que a doxiciclina inibe a resposta dos osteoclastos e, conseqüentemente, diminui a perda óssea alveolar.

Preshaw et al. (2004) considerou o mecanismo de raspagem radicular e polimento como padrão de tratamento da doença periodontal. Recentes pesquisas mostraram que os maiores componentes da destruição de tecidos duros e moles resultam da resposta inflamatória do hospedeiro através dos mediadores pró-

inflamatórios e enzimas como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMP). Novos tratamentos visam combinar terapias convencionais com terapias modulatórias da resposta inflamatória do hospedeiro. Neste estudo, os autores avaliaram a eficácia e a dose de segurança da doxiciclina, considerando os parâmetros clínicos analisados em estudos que envolvem a associação desta terapia a uma terapêutica convencional. Os autores sugerem que a terapia convencional é eficaz no controle das modificações teciduais geradas pela microbiota e que, quando se pretende um tratamento individualizado para determinados fatores de risco, a associação de dose subantimicrobiana de doxiciclina pode ser um protocolo aceitável.

Lee et al. (2004) investigaram a eficácia clínica da prescrição de dois medicamentos moduladores da resposta do hospedeiro na diminuição dos níveis gengivais de enzimas colagenolíticas em pacientes com periodontite crônica. Participaram deste estudo 19 pacientes com periodontite crônica que tinham indicação de cirurgia de retalho mucoperióstico bilateral no arco superior. Os indivíduos foram divididos em três grupos: dose subantimicrobiana de flurbiprofeno (SDF) 50 mg/4xdia, dose subantimicrobiana de doxiciclina (SDD) 20 mg/2xdia ou, uma combinação das duas (COMB). A biópsia de tecido foi obtida durante a cirurgia primeiramente do lado direito, depois se iniciava a prescrição dos medicamentos e, três semanas após, era realizado o procedimento do lado esquerdo. As análises realizadas tiveram o objetivo de quantificar a atividade da collagenase, gelatinase, e elastase no tecido gengival. Os resultados mostraram que SDD isolada reduziu os níveis de metaloproteinases da matriz extracelular e, a SDF não reduziu estas enzimas. Os melhores resultados foram observado no grupo COMB para todas as enzimas testadas. Baseados nestes resultados os autores concluíram que o uso

combinado destes medicamentos pode apresentar ação sinérgica na modulação das metaloproteinases da matriz extracelular e de outras proteases neutras em pacientes portadores de periodontite crônica.

Gapski et al. (2004) fizeram um estudo sobre o aspecto da resposta biológica causada pela doxiciclina em concentração de baixa dose na inibição de metaloproteinases na modulação do reparo na doença periodontal. Em um período de 12 meses foram analisados pacientes com periodontite crônica severa, que apresentassem dez dentes em função, ausência de sensibilidade à tetraciclina, fora do período de gestação ou de lactação, não fumantes, sem doenças infecciosas, que não estivessem tomando medicamentos esteroidais. Neste estudo duplo-cego, teste e placebo, randomizado, os autores avaliaram parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, análise microbiana e do fluido gengival. As avaliações foram executadas no período de três, seis, nove e 12 meses, sendo que no período de seis meses iniciais, foram administradas 20 mg de doxiciclina para o grupo teste e 20 mg de cápsula de placebo no grupo controle. Os pacientes tratados com dose subantimicrobiana de doxiciclina apresentaram uma redução mais significativa nos parâmetros clínicos com retalho no palato em sítios com mais de 6 mm. Não houve diferença estatística significativa na redução de patógenos entre os grupos. Estes resultados sugerem que dose subantimicrobiana de doxiciclina em combinações com cirurgias a retalho pode melhorar a resposta da terapia cirúrgica e reduzir a profundidade de sondagem na doença periodontal crônica severa, com redução na reabsorção óssea.

Salvi e Lang (2005), em sua revisão de literatura, evidenciaram que a terapia periodontal não cirúrgica e administração de 20 mg de dose subantimicrobiana de doxiciclina, duas vezes por dia no prazo de 12 meses, beneficiou a modulação da

resposta do hospedeiro sobre a perda óssea alveolar em pacientes com periodontite crônica.

## 2.5 Periodontite experimental

A doença periodontal apresenta uma patogenia de difícil estudo em humanos, por motivos éticos, pois a evolução da doença bem como os reparos dos tecidos após a terapia não podem ser avaliados por algumas ferramentas sensíveis como as avaliações histológicas, histométricas e imunohistoquímicas. Dentre os animais em que se podem estudar a periodontite experimental, o rato (*Rattus Novergicus*), tem apresentado vantagens, como seu baixo preço e fácil manipulação e a possibilidade de obtenção da condição germ-free. Os molares apresentam características histológicas muito parecidas com as dos humanos, tendo como variação principal a queratinização do epitélio do sulco gengival. Nestes animais a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista alveolar permanece constante na superfície vestibular no periodonto sem doença, entretanto, uma alteração fisiológica idade dependente pode ser observada na face lingual e palatina. Sendo assim, o uso de animais com a mesma idade é um detalhe importante para evitar fatores de confusão quando estas referências anatômicas forem utilizadas como ferramentas de avaliação. Além disso, informações relacionados à quantificação do infiltrado inflamatório, da perda de inserção e da atividade de osteoclastos só podem ser levantadas diretamente a partir de estudo histológico em modelos animais. Outro aspecto importante é a combinação de vários métodos de avaliação para cada objetivo do estudo da evolução da doença periodontal,

considerando aplicabilidade de mais de uma ferramenta para abordagem de diferentes aspectos da doença periodontal (KLAUSEN, 1991).

Klausen, Evans e Sfintescu (1989) fizeram um estudo com 25 ratos com doença periodontal experimental no qual avaliaram métodos radiográficos para detectar defeitos ósseos interproximais e métodos morfométricos para avaliar perda óssea horizontal. Foi utilizado microscópio óptico (lupa estereoscópica) para medir a distância da junção amelocementária à crista óssea alveolar em 36 locais da boca de cada animal. Nas radiografias mandibulares foram observados defeitos no osso alveolar de suporte; localizado no ápice distalmente aos primeiros molares, sendo todas as medidas realizadas em duas sessões separadas. No segundo experimento, 50 maxilas de ratos foram também avaliadas por esses métodos e a correlação foi estimada pela análise de Spearman. A reprodução de ambos os métodos foi satisfatória. Concluíram que futuros estudos podem ser beneficiados pelos métodos para avaliar perda ósseo-alveolar em ratos.

Galvão et al. (2003) apresentaram uma técnica e um método de descrição das características histológicas da doença periodontal induzida em ratos. Fez-se a indução de periodontite com o uso de ligaduras, com ou sem dieta rica em sacarose. Foram incluídas vinte e quatro ratas (Wistar) adultas (sessenta dias) e estas foram divididas em quatro grupos: Grupo 1, ou controle (recebeu dieta padrão), Grupo 2 (recebeu ligadura ao redor dos segundos molares superiores e dieta padrão), Grupo 3 (recebeu dieta rica em sacarose) e Grupo 4 (recebeu ligadura ao redor dos segundos molares superiores e dieta rica em sacarose). Os animais foram acompanhados por um período de trinta dias, ao final do qual foram sacrificados. Os segundos molares superiores foram removidos e processados; fez-se análise histológica por método descritivo. Os animais com ligadura (Grupo 2 e 4) mostraram

características histológicas de periodontite como epitélio juncional aumentado, tecido conjuntivo com número de células e vasos aumentado, fibras do ligamento inseridas apicalmente à crista óssea alveolar sendo esta irregular e apresentando lacunas de Howship, enquanto animais sem ligadura não apresentaram sinais de destruição periodontal. O uso de ligaduras, no presente estudo, foi capaz de promover processo inflamatório crônico nas ratas, independentemente do tipo de dieta. A análise fatorial de correspondência serviu como método para mostrar tais características, sendo mais uma ferramenta para uso em pesquisa básica.

Kuhr et al. (2004) tiveram o propósito de avaliar a destruição periodontal marginal, periodontite induzida experimentalmente em ratos por ligadura no segundo molar superior num período de sessenta dias. Foram utilizados 35 ratos, Sprague-Dawley, com idade entre quatro e 4,5 meses, divididos em cinco grupos divididos segundo os prazos de sacrifícios: grupo 1 - cinco dias, grupo 2 – 15 dias, grupo 3 – trinta dias, grupo 4 – sessenta dias, grupo 5 – controle sem indução. Os espécimes de maxila foram avaliados em relação a distância união cimento – esmalte em medidas lineares e de área de exposição radicular. Após o sacrifício, foram feitas análises medindo a distância da junção cimento-esmalte e crista óssea alveolar e a área da exposição de superfície dos molares. Os resultados encontrados demonstraram que o grupo 1 comparado com o grupo 4 demonstrou perda óssea alveolar em ambas análises. Ambos os métodos demonstraram que a ligadura induziu a perda óssea significativa já no primeiro prazo de sacrifício e que ocorreu uma estagnação da destruição óssea no decorrer dos sessenta dias. Os autores concluíram que a aplicação deste modelo é recomendada em curto período experimental.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso sistêmico de dose subantimicrobiana de doxiciclina sobre a perda óssea alveolar e a inserção conjuntiva em periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal em ratas.



## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais

Para este experimento foram utilizadas 25 ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com dez semanas de idade pesando ao redor de 250g, mantidas em gaiolas, em temperatura ambiente, alimentadas com água e ração *ad libitum*, fornecido pelo biotério do Instituto Básico de Biociência da Universidade de Taubaté. As ratas foram divididas em cinco grupos: grupo 1 (controle), sem ligadura, sem sobrecarga e sem medicação; grupo 2, com ligadura, sem sobrecarga e sem medicação; grupo 3, sem ligadura, com sobrecarga e sem medicação; grupo 4, com ligadura, com sobrecarga e sem medicação; grupo 5, com ligadura, com sobrecarga e com medicação (Tabela 1 e Figura 1). Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNITAU, protocolo número 010/2005 (Anexo A).

Tabela 1 - Grupos experimentais

Grupos	Ligadura	Trauma	Medicação
GC	Sem	Sem	Sem
GL	Com	Sem	Sem
GT	Sem	Com	Sem
GLT	Com	Com	Sem
GLTD	Com	Com	Com

GC- controle, GL- ligadura, GT- trauma, GLT- ligadura e trauma, GLTD- ligadura, trauma e doxiciclina

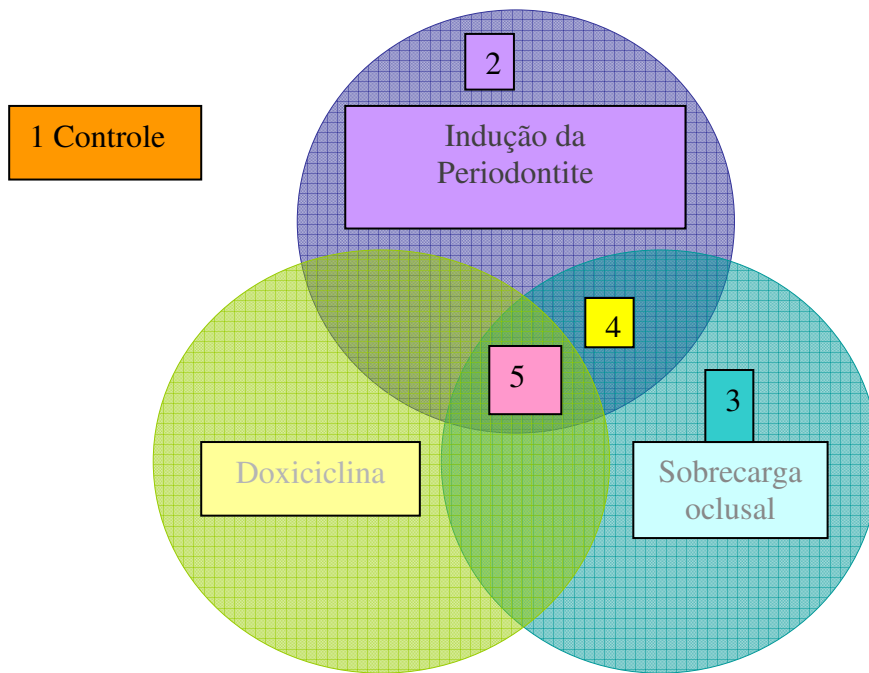


Figura 1 - Esquema dos grupos experimentais

Grupo 1 (controle), sem ligadura, sem sobrecarga e sem medicação; grupo 2, com ligadura, sem sobrecarga e sem medicação; grupo 3, sem ligadura, com sobrecarga e sem medicação; grupo 4, com ligadura, com sobrecarga e sem medicação; grupo 5, com ligadura, com sobrecarga e com medicação

#### 4.2 Anestesia

Para a inserção de ligadura, os animais foram pesados e anestesiados, com anestesia geral e relaxante muscular.

A solução anestésica foi composta de cloridrato de xilazina (Anasedan, do laboratório Vetbrands) com o relaxante muscular com Ketamina base (Dopalen, do laboratório Vetbrands) como anestésico geral, na proporção de 1: 0,5 ml, utilizando 0,1 ml para cada 100 g de peso do animal (RICARDO, 2002).

### 4.3 Indução da periodontite

Os animais foram pesados antes da colocação das ligaduras para determinar se houve o ganho ou a perda de peso após a inserção da ligadura e para a quantificação do anestésico geral e relaxante muscular, que foram utilizados para anestesia. Para a indução da periodontite, os animais receberam a inserção de um fio de linha de algodão marca corrente, nº 10, em torno do primeiro molar inferior do lado direito. A ligadura foi atada no lado mesial mantendo-se subgingival nas faces distal e lingual e na face vestibular (Figura 2).

A ligadura foi mantida por um prazo de 28 dias. Durante este período os animais passaram por uma verificação semanal da estabilidade da ligadura dentro do sulco gengival.



Figura 2 - Instalação da ligadura

#### 4.4 Aplicação da sobrecarga oclusal

Para a aplicação da sobrecarga oclusal sobre os primeiros molares, foi realizado um desgaste das superfícies oclusais dos segundos e terceiros molares superiores para a eliminação dos contatos oclusais, sem exposição pulpar. Esta condição foi mantida nos grupos experimentais números 3, 4 e 5 (Figura 3).



Figura 3 - Desgaste oclusal

#### 4.5 Tratamento

Os animais pertencentes ao grupo 5, receberam doses diárias de 0,14 mg de doxiciclina na concentração de 0,7 mg/ml, aplicadas por via oral durante o período de indução da doença periodontal (Figura 4).



Figura 4 - Aplicação de dose subantimicrobiana de Doxiciclina

#### 4.6 Sacrifício

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados e decapitados com uma guilhotina e as mandíbulas foram removidas e mantidas no formol a 10%. As hemimandíbulas do lado direito foram encaminhadas para análise radiográfica e o lado esquerdo encaminhadas para análise histológica.

#### 4.7 Análise radiográfica

As peças cirúrgicas foram submetidas à avaliação radiográfica utilizando o Sistema de imagem Radiográfica intraoral Digital RVG ® (RADIOVISIOGRAPHY – Trophy radiology inc. – Marietta / USA), o qual emprega Dispositivos de Carga Acoplada (sensor – CCD) para captura direta das imagens. As tomadas radiográficas foram realizadas utilizando aparelho de raios x digital Gendex 765DC® (Gendex, Dentisply, Internacional, USA), com o tempo de exposição 0,08 segundos com distância focal do sensor de trinta centímetros.

Foram fixados pontos para mensuração do suporte ósseo periodontal. Os pontos foram colocados na porção mais coronária da cúspide dental distal, na ponta da crista óssea ou defeito ósseo e no ápice radicular, estes pontos foram transportados como medidas lineares para mensuração do suporte ósseo periodontal (SPO) demonstrado na Figura 5 (KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989). O cálculo teve como resultado um valor percentual expresso pelas proporções entre as medidas obtidas (Figura 6).

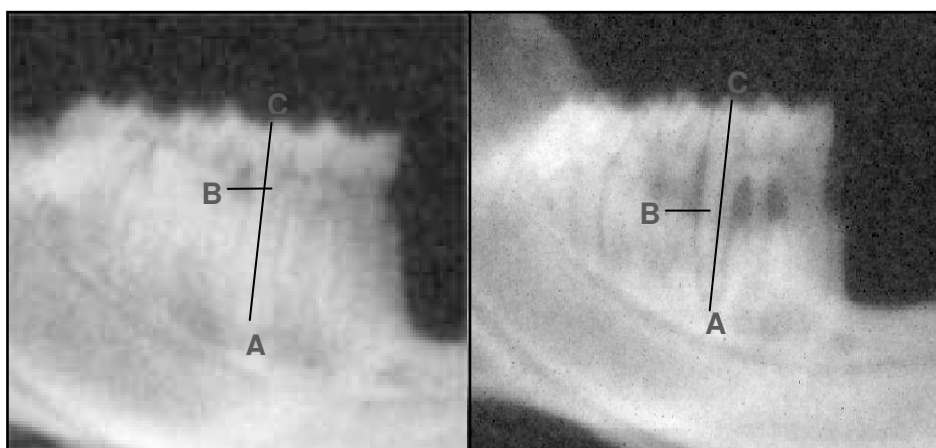


Figura 5 - Análise radiográfica

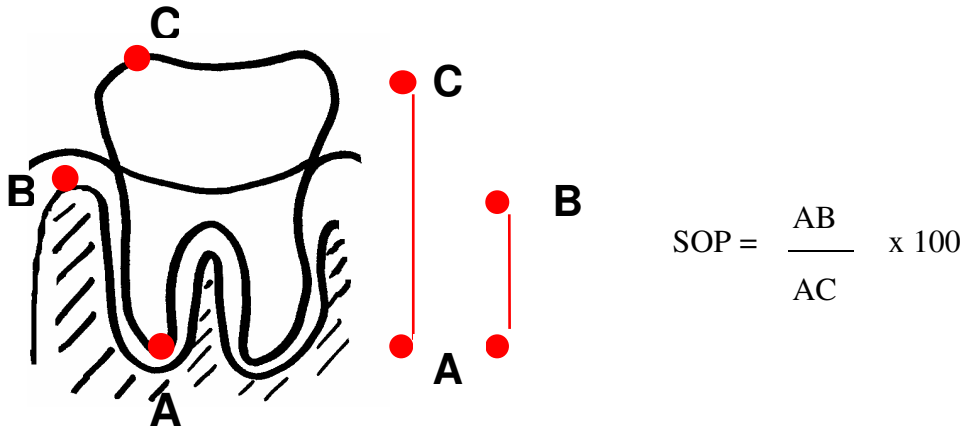


Figura 6 - Fórmula para cálculo do SOP

#### 4.8 Análise histológica

As peças encaminhadas para o processamento histológico foram descalcificadas em solução de EDTA 17%, sendo consideradas descalcificadas por meio do teste de penetração de agulha. As peças descalcificadas foram incluídas em parafina com a face vestibular voltada para o plano de corte. Foram realizados cortes seriados de 6  $\mu\text{m}$ , no sentido méso-distal nos quais foi avaliada a perda de inserção conjuntiva na face distal do primeiro molar inferior. Os pontos de referência considerados para a mensuração da perda de inserção foram a junção esmalte-cemento e o início da inserção de fibras do ligamento periodontal no cemento radicular. Sendo assim, toda extensão de cemento sem a inserção de fibras colágenas foi considerada como área de perda de inserção.

O procedimento de mensuração foi realizado em duplicata e foi feita uma média entre as medidas para cada animal e posteriormente para cada grupo experimental. Para a análise histométrica foi utilizado um software de leitura de imagens, Image Tool versão 2.0, de domínio público (Figura 7).

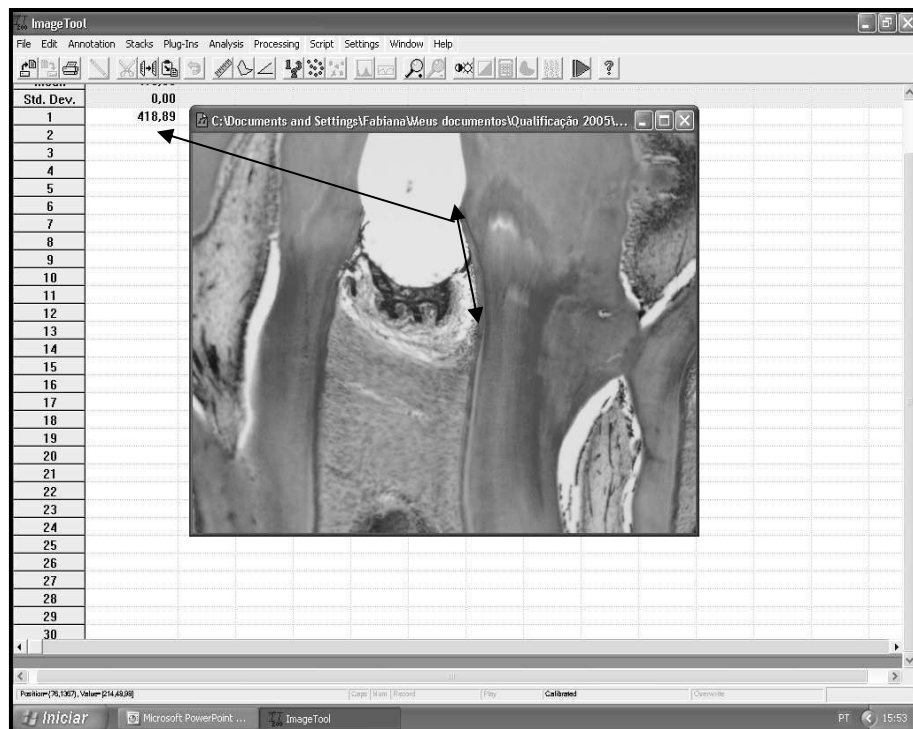


Figura 7 - Medida Linear

#### 4.9 Análise estatística

Os dados obtidos à partir das avaliações realizadas foram analisados estatisticamente para as variáveis: ligadura, sobrecarga oclusal e medicamento. Os valores médios obtidos por grupo experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando observadas diferenças estatísticas significativas, estes dados foram submetidos ao teste de comparação múltipla de Tukey para a



verificação da influência das variáveis sobre os resultados observados. Foi adotado o nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise radiográfica

Na análise radiográfica avaliamos o suporte ósseo periodontal (SOP), Expressado na tabela 2.

Tabela 2 - Estatística descritiva de SOP(%)

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
GC	5	48,64	61,92	55,492	4,8688
GL	5	40,25	51,44	46,738	4,8004
GT	5	55,94	64,03	60,032	3,3774
GLT	5	48,07	54,80	51,698	2,8489
GLTD	5	52,99	63,64	57,766	4,5000

GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxiciclina)

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e como resultados desta análise observaram-se diferenças estatísticas ( $p = 0,001$ ). Demonstrado as diferenças dos grupos pelo método de análise múltiplas comparações de Tukey Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das comparações múltiplas de Tukey entre os grupos

Grupos	Comparações	$p$
GC	GL	0.025*
	GT	0.442
	GLT	0.609
	GLTD	0.907
GL	GT	0.001*
	GLT	0.357
	GLTD	0.004*
GT	GLT	0.035*
	GLTD	0.908

GLT	GLTD	0.184
GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxiciclina)		

O grupo controle teve diferença significativa em relação ao grupo ligadura, provando a indução da doença periodontal. No grupo ligadura apresentou diferenças com os grupos GT e GLTD, e o grupo GT teve diferença com o grupo GLT entre os grupos GLT e GLTD não apresentou diferença significativa. Através da análise de Tukey descrevemos os grupos homogêneos (Tabela 4).

Tabela 4 - Posição dos grupos homogêneos pela análise de Tukey

Grupos	Média ± Desvio Padrão (%)	Grupos Homogêneos*		
GL	46,738 ± 4,8004	A		
GLT	51,698 ± 2,8489	A	B	
GC	55,492 ± 4,8688		B	C
GLTD	57,766 ± 4,5000		B	C
GT	60,032 ± 3,3774			C

\* Letras iguais representam ausência de diferença estatística significativa GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxiciclina)

Valores de SOP plotados no o gráfico (Gráfico 1) descrevem a relação entre os grupos experimentais.

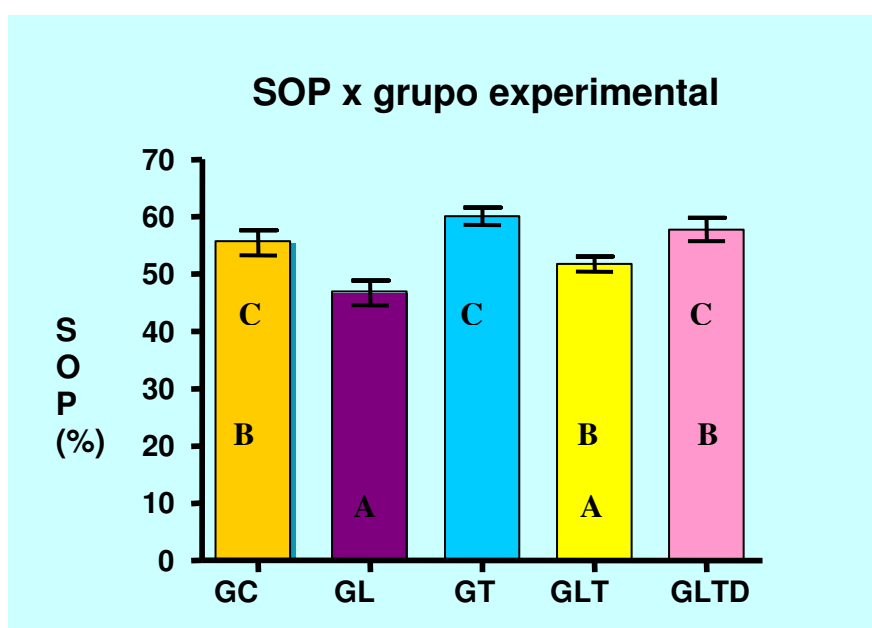


Gráfico 1 - Representativo de SOP para todos os grupos experimentais

## 5.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica (Tabela 5), expressa medidas lineares da perda de inserção.

Tabela 5 – Estatística descritiva de PI (mm<sup>2</sup>)

Grupos	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
GC	5	0,04	0,23	0,1163	0,07432
GL	5	0,28	0,55	0,4115	0,09500
GT	5	0,04	0,31	0,1216	0,10922
GLT	5	0,47	0,75	0,5847	0,12118
GLTD	5	0,41	0,67	0,5444	0,12237

GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxiciclina)

Temos comparações múltiplas dos grupos na Tabela 6. Sendo  $p = 0,0001$ .

Tabela 6 - Resultado de comparações múltiplas de Tukey dos valores médios por grupos experimentais para perda de inserção

Grupos	Comparações	P
GC	GL	0.002*
	GT	1.000
	GLT	0.000*
	GLTD	0.000*
GL	GT	0.003*
	GLT	0.111
	GLTD	0.309
GT	GLT	0.000*
	GLTD	0.000*
GLT	GLTD	0.973

GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxiciclina)

O grupo controle teve diferença significativa em relação aos grupos GL, GLT e GLTD, e o grupo GL teve diferença significativa em relação ao grupo GT, e o grupo GT apresentou diferença significativa com os grupos GL, GLT e GLTD.

Com análise de Tukey podemos demonstrar as diferenças dos grupos (Tabela 7).

Tabela 7 - Grupos homogêneos através da análise de Tukey para perda de inserção

Grupos	Média ± Desvio Padrão	Grupos	Homogêneos*
GC	0.1163 ± 0.07432	A	
GT	0.1216 ± 0.10922	A	
GL	0.4115 ± 0.09500		B
GLTD	0.5444 ± 0.12237		B
GLT	0.5847 ± 0.12118		B

GC (controle), GL (com ligadura), GT (com trauma), GLT (com ligadura e trauma), GLTD (com ligadura, trauma e doxíciclina)

Expresso pelo gráfico a perda de inserção nos grupos experimentais (Gráfico 2).

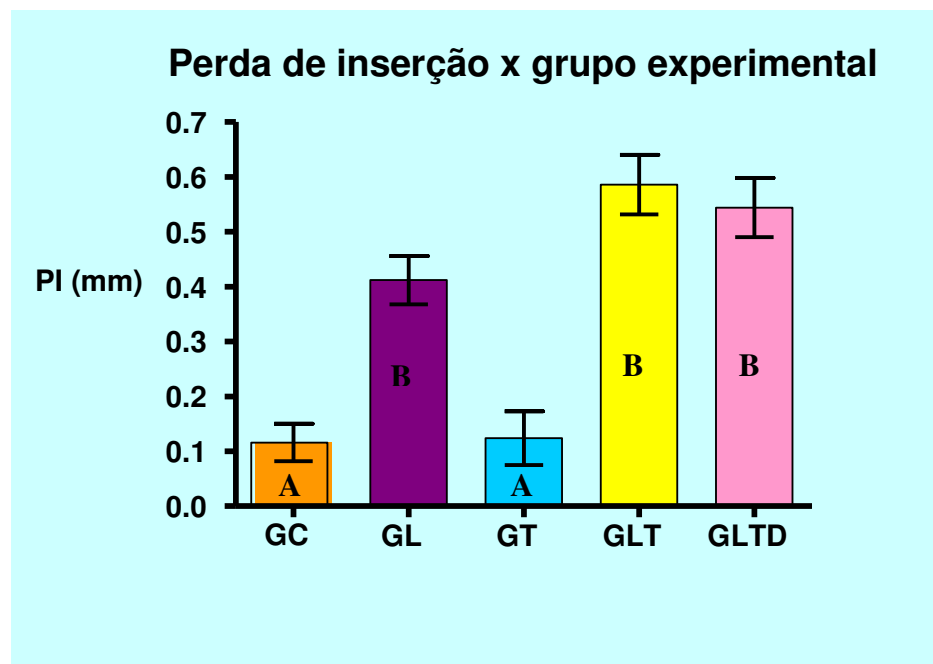


Gráfico 2 - Valores médios de perda de inserção plotados dos grupos experimentais

### 5.3 Análise histológica descritiva

A análise histológica foi realizada por microscopia óptica, na qual foram observados cortes que apresentavam fragmento de mandíbula contendo primeiro, segundo e terceiro molares. Os cortes foram realizados no sentido méso-distal e apresentaram características histológicas diferentes. Foram selecionados os primeiros cortes em que se observou o desaparecimento da raiz mediana do primeiro molar em que se visualizava a raiz distal deste dente de forma que permitisse a avaliação da inserção de fibras do ligamento periodontal.

O grupo controle, utilizado como parâmetro de referência em relação aos outros grupos, apresentou característica de um periodonto saudável, o qual apresentava a região inter-proximal entre primeiro e segundo molar preenchida com a papila gengival com formato triangular, revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado. Nestes cortes o epitélio juncional encontrava-se posicionado sobre o espaço ocupado pelo esmalte dental e sua porção mais apical coincidindo com a junção cimento-esmalte. Nestes cortes o cimento radicular apresentava-se com fibras do ligamento periodontal inseridas em toda a sua extensão. Na região de bifurcação do primeiro molar observou-se um preenchimento por tecido ósseo mais compacto e ligamento periodontal com dimensões uniformes em todo teto da bifurcação. Da mesma forma estas características histológicas puderam ser observadas no grupo trauma, no teto da bifurcação o tecido ósseo apresentou superfície irregular com área de reabsorção (Figura 8).

Já nos grupos GL, GLT e GLTD o espaço interproximal mostrou-se preenchido por papila gengival com formato côncavo também revestida por epitélio

pavimentoso estratificado não queratinizado. Nestes cortes observou-se que o epitélio estava sobre o cimento radicular, em posição apical à união esmalte cimento, caracterizando a perda de inserção de fibras do ligamento sobre o cimento nesta região. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresentou-se moderadamente infiltrado por células inflamatórias mononucleadas. Na região de bifurcação radicular do primeiro molar observou-se um aumento do espaço do ligamento periodontal no grupo ligadura. No GLT além da perda óssea e do aumento do espaço periodontal observou-se em alguns cortes presença de epitélio junto ao teto da bifurcação caracterizando a perda de inserção nesta região. Já no grupo GLTD, observou irregularidade no septo ósseo inter-radicular com aumento do espaço do ligamento, porém não foi observado presença de epitélio (Figura 9).

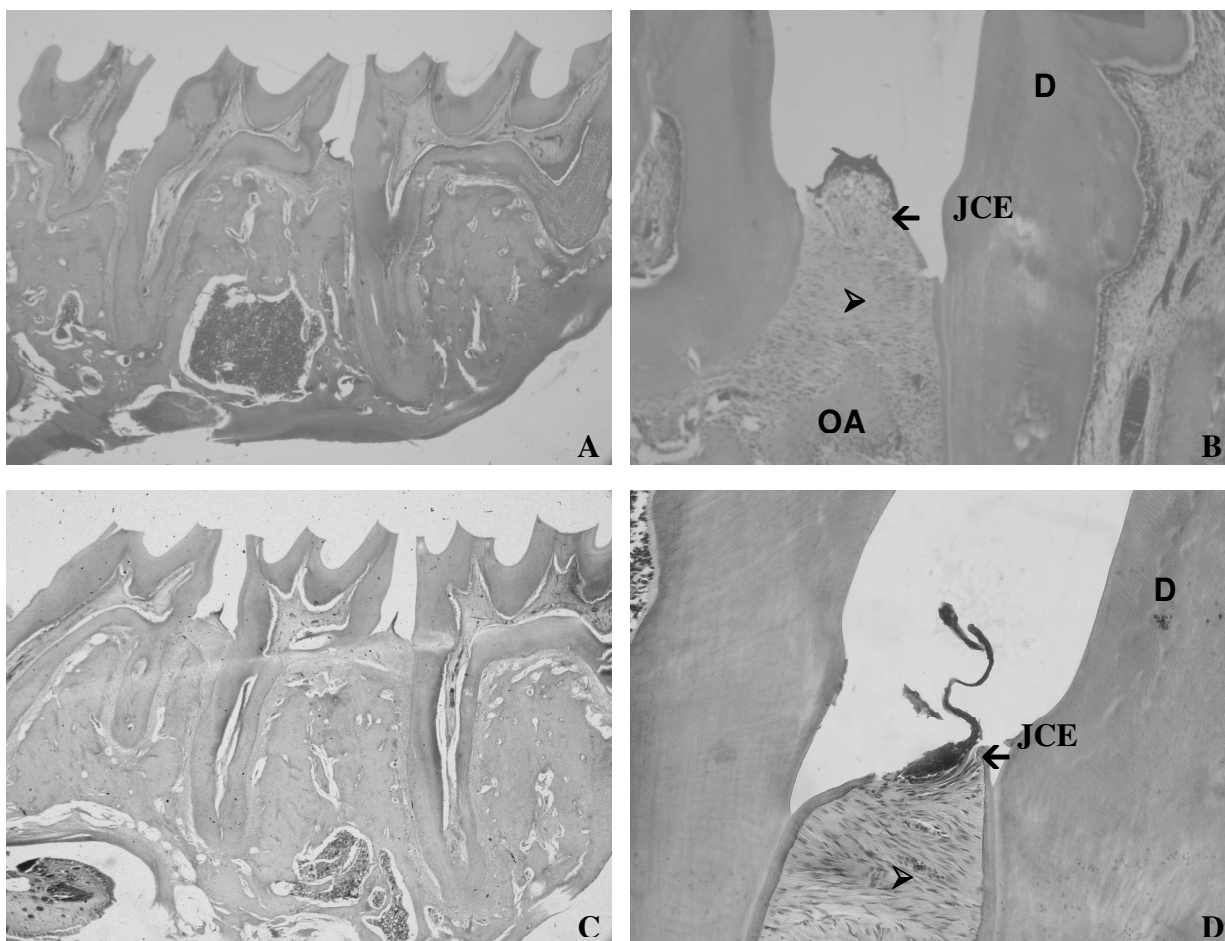


Figura 8 - Análise dos grupos sem ligadura

**A** fragmento com três molares inferiores do GC com aumento 25x HE, **B** vista interproximal dos 1° e 2° MI do GC, **D** dentina, **OA** osso alveolar, **JCE** união cimento-esmalte, **➤** fibras transeptais, **←** inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; **C** fragmento com três molares inferiores do GT, aumento com 25x HE; **D** vista inter proximal dos 1° e 2° MI do GT, **D** dentina, **JCE** união cimento-esmalte, **➤** fibras transeptais, **←** inserção conjuntiva com aumento 200x HE



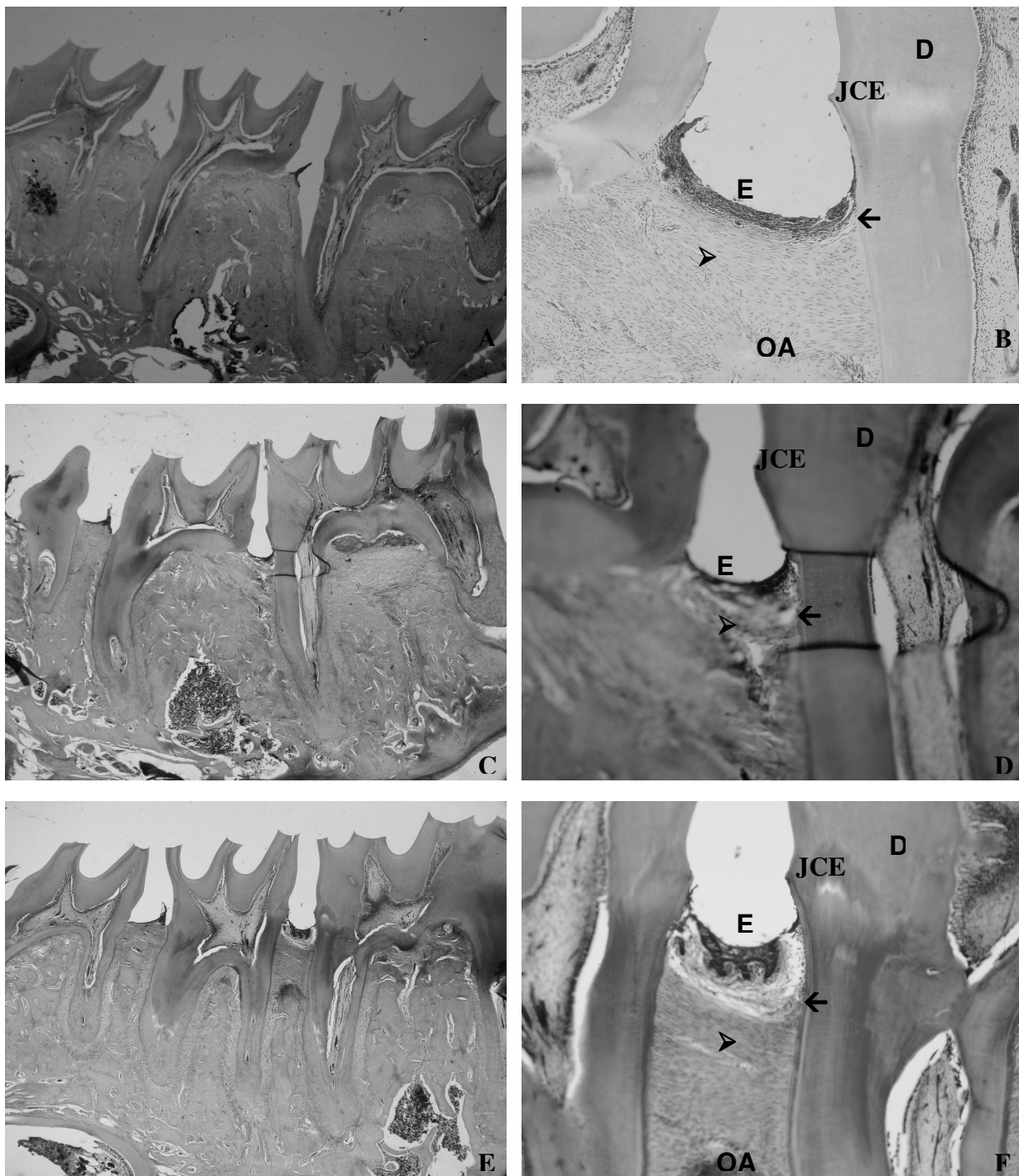


Figura 9 Análise dos grupos com ligadura

A fragmento com três molares inferiores do GL com aumento com 25x HE, B vista interproximal do 1° e 2° MI do GL; D dentina, ▶ fibras transeptais, E epitélio juncional, OA osso alveolar, JCE união cimento-esmalte, ◀ inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; C fragmento com três molares inferiores do GLT; D vista interproximal do 1° e 2° MI do GLT, D dentina, ▶ fibras transeptais, E epitélio juncional, JCE união cimento-esmalte, ◀ inserção conjuntiva com aumento com 200x HE; E fragmento com três molares inferiores do GLTD; F vista interproximal do 1° e 2° MI do GLTD; D dentina, ▶ fibras transeptais, E epitélio juncional, OA osso alveolar, JCE união cimento-esmalte, ◀ inserção conjuntiva com aumento com 200x HE

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo procurou avaliar o efeito modulatório de dose subantimicrobiana de doxiciclina no suporte ósseo alveolar e perda de inserção conjuntiva decorrente da periodontite induzida por ligadura associada à sobrecarga oclusal em molares de ratas.

O controle de fatores de confusão que ocorre nos estudos em humanos em relação à doença periodontal pode ser uma indicação importante para o uso de modelos animais em estudos que avaliam a instalação e a evolução da doença periodontal bem como, a resposta a procedimentos terapêuticos. Klausen (1991) já comentava a importância de superar as limitações, dificuldades e interferências destes fatores nos estudos em humanos. Da mesma forma, Benatti (2003) e Nociti Júnior et al. (2000, 2001) comentaram que a utilização de ratos, quando da realização de estudos experimentais, pode favorecer avaliação da influência de determinados fatores de risco sobre a instalação e o agravamento da doença periodontal.

Dentre as características anátomo fisiológicas dos ratos em relação à patogenia da doença periodontal, um fator a ser considerado é a continuidade da erupção dentária e o desgaste oclusal dos molares nestes animais, que ocorre com o avançar da idade. Sendo assim, o uso de animais com a mesma idade é um detalhe importante para evitar fatores de confundimento quando estas referências anatômicas são utilizadas como ferramentas de avaliação. No presente estudo, este foi um critério adotado e os animais tiveram idade e peso equivalentes em todos os grupos experimentais.

A indução da periodontite por meio de instalação de uma ligadura tem sido utilizada em estudos em ratos, por vários autores (GALVÃO et al., 2003; GASPERSIC et al., 2003; KLAUSEN, 1991; NOCITI JÚNIOR et al., 2001). Nesses estudos têm sido avaliadas as alterações nos tecidos periodontais tanto por meio radiográfico (KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989); morfométricos (GASPERSIC et al., 2003); histomorfométrico (NOCITI JÚNIOR et al., 2001); biologia molecular (KARIMBUX et al., 1998). Independentemente da metodologia utilizada, estes autores comprovam em seus estudos, alterações dentre outras, como a reabsorção óssea alveolar e a perda de inserção conjuntiva (GALVÃO et al., 2003; LU et al., 1999).

A periodontite induzida em ratos pode ser avaliada pelos métodos radiográficos, histométrico, histológico e morfométrico. É importante enfatizar que nenhum dos métodos isoladamente é capaz de abranger todos os aspectos da doença periodontal e que, dependendo da proposição do estudo, várias combinações de análise podem ser aplicadas (KLAUSEN, 1991). Desta forma, este estudo optou por combinar algumas das metodologias citadas acima a fim de avaliar estes aspectos complementares.

No presente estudo, a periodontite induzida por ligadura também gerou alterações no SOP, observadas radiograficamente e na perda de inserção, observadas histologicamente. Este resultado tornou possível a avaliação da influência da aplicação de um fator de risco e de um procedimento terapêutico sobre as estruturas periodontais.

A análise radiográfica utilizada neste estudo foi a que identifica o suporte ósseo periodontal remanescente da raiz distal do primeiro molar (KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989). Sua vantagem é o fato de ser um dado percentual em

relação ao comprimento do dente, diminuindo assim distorções decorrentes da dificuldade de padronização da posição das amostras para obtenção das imagens radiográficas. Por outro lado, ocorre uma dificuldade de identificação exata dos pontos de referências a serem avaliados sendo necessários que as mensurações sejam repetidas para a calibração de examinador.

Outro aspecto a ser considerado foi o período experimental. Kuhr et al. (2004) observou em seu estudo que as alterações teciduais decorrentes da periodontite induzida podem ser observadas até o décimo quinto dia após a instalação da ligadura, e que a partir deste prazo, estas alterações se mantiveram até o prazo de observação de sessenta dias. No presente estudo o prazo de 28 dias de indução foi suficiente para avaliação da perda óssea nos animais que receberam ligadura. Porém, este prazo também foi suficiente para a adaptação oclusal dos animais em que foi realizado o desgaste oclusal dos segundos e terceiros molares superiores para a criação de sobrecarga oclusal dos primeiros molares inferiores. A partir desta adaptação e extrusão, a região inter proximal entre o primeiro e segundo molar inferior apresentou alterações no SOP, caracterizadas pelo acompanhamento da crista óssea nos animais em que não foi instalada a ligadura.

A utilização de sobrecarga oclusal como fator de risco para doença periodontal foi o modelo experimental do estudo de Nogueira-Filho et al. (2004). Os autores avaliaram as alterações na bifurcação de primeiros molares inferiores, utilizando modelos animais em que a sobrecarga era criada devido ao desgaste oclusal dos segundos e terceiros molares. Neste estudo, a região avaliada foi a bifurcação radicular que, mesmo considerando a adaptação oclusal, apresentou diferenças estatísticas entre os grupos que associaram sobrecarga oclusal a ligadura e a nicotina. No presente estudo, a área escolhida para avaliação das alterações do

periodonto foi a face distal do primeiro molar inferior e por estar próximo à região de adaptação oclusal dos dentes extruídos, pode ter sofrido alguma interferência no que diz respeito à avaliação radiográfica do SOP.

A presença de trauma oclusal como fator de risco para doença periodontal já foi um tema amplamente discutido por Harrel (2003) em revisão de literatura. Nessa revisão, os autores comentaram que as alterações decorrentes à sobrecarga oclusal só são observadas no periodonto de forma irreversível quando associadas ao biofilme dental.

Segundo Gaspersic et al. (2003), o agravamento da doença periodontal pode ser desenvolvido por fatores de risco, do tipo estresse ou trauma, os quais de uma forma individualizada, não teriam potencial para iniciarem a doença. No presente estudo, as características observadas no grupo trauma apresentaram-se equivalentes às aquelas observada no grupo controle, tanto nas avaliações do SOP como na perda de inserção. Em relação à avaliação radiográfica, pôde-se observar que os valores médios de SOP do grupo trauma foram inclusive numericamente maiores que os do grupo controle. Já considerando a avaliação histológica, a principal característica observada foi que os animais que receberam sobrecarga sem instalação da ligadura não apresentaram perda de inserção significativa quando comparados aos animais do grupo controle. Esta característica histológica vem justificar os argumentos de Gaspersic et al., pois, a ausência de perda de inserção está diretamente associada à ausência de doença periodontal que só foram observada nos animais nos quais foi inserida ligadura.

Quando a associação da presença de ligadura e sobrecarga oclusal foi comparada com os grupos que apenas receberam ligadura, observou-se que houve agravamento das alterações. Porém, os valores médios dos referidos grupos quando

submetidos à análise estatística apresentaram-se equivalentes entre si. Esses resultados podem ser devido ao pequeno número de animais por grupo e à variabilidade dentro de cada grupo que gerou a ocorrência de um desvio padrão em relação a médio de cada grupo.

A modulação da resposta do hospedeiro reduzindo as alterações teciduais decorrentes da doença periodontal foi revisada por Salvi e Lang (2005). Nesta revisão os autores discutem a habilidade do protocolo terapêutico com a utilização de dose subantimicrobiana de doxiciclina na modulação da perda óssea por meio inibidores sintéticos da atividade enzimática de MMP teciduais.

O período de utilização deste medicamento tem sido pesquisado quanto à ocorrência de bactérias resistentes. Da mesma forma, Preshaw et al. (2004), discutiram por meio de revista de literatura que a doxiciclina usada em doses subantimicrobiana e por período prolongado tem sido associada à melhora nos parâmetros clínicos sem a ocorrência de resistência das bactérias à tetraciclina. Esta modulação já havia sido apresentada por Ashley (1999), num protocolo de utilização de 12 semanas de terapia com dose subantimicrobiana de doxiciclina associada à terapia periodontal mecânica com raspagem e alisamento radicular. Da mesma forma, a modulação da ação enzimática da colagenase sobre a inserção conjuntiva foi evidenciada por Karimbux et al. (1998). Já o estudo de Bezerra et al. (2002), observou em um período curto de administração da dose subantimicrobiana de doxiciclina, obteve um efeito inibitório da resposta do hospedeiro no periodonto.

No presente estudo a modulação das alterações periodontais decorrentes da periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal não foram evidenciadas tanto pela análise do SOP como pela avaliação histológica da perda de inserção. Como observados nos resultados, o valor médio de SOP no grupo que recebeu dose diária

de doxiciclina foi numericamente maior que o grupo sem medicação, porém estes valores foram estatisticamente equivalentes. Da mesma forma, na avaliação histológica as características observadas nos animais que receberam doses diárias de doxiciclina apresentaram diminuição da extensão de cemento sem a inserção de fibras do ligamento periodontal e ausência de epitélio junto ao teto da bifurcação radicular nos molares em que foi inserida a ligadura. No entanto, a quantificação destas alterações quando submetida ao teste estatístico também mostrou valores médios equivalentes entre os grupos tratados ou não com doxiciclina. Sendo assim, neste modelo experimental não foi possível a comprovação dos achados da literatura na verificação da modulação da perda óssea e perda de inserção em periodontite experimental induzida em ratas e associada ao fator de risco representado pela sobrecarga oclusal. A utilização deste protocolo com maior número de animais e com a utilização de ferramentas mais sensíveis como a biologia molecular para a dosagem de mediadores inflamatórios pode ser um recurso favorável na verificação destes achados e tema para futuros estudos que testem a eficácia deste protocolo terapêutico.

## **7 CONCLUSÃO**

A utilização sistêmica de dose subantimicrobiana de doxiciclina não modificou a perda óssea alveolar e a inserção conjuntiva no periodonto de ratas com periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal. O trauma não agravou a doença periodontal no grupo com e sem ligadura.



## REFERÊNCIAS

ASHLEY, R. A. Clinical trials of a matrix metalloproteinase inhibitor in human periodontal disease. SSD clinical research team. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 30, n. 878, p. 335-346, June 1999.

BENATTI, B. B. et al. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 351-533, June 2003.

BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 5, p. 613-616, Mar. 2002.

BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, June 2000.

CARRANZA, F. A. Perda óssea e padrões de destruição óssea, In: CARRANZA, N.T. (Org.). **Carranza Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 316-330.

CATON, J. G. et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 71, n. 4, p. 521-532, Apr. 2000.

EICKHOLZ, P. et al. Radiographic parameters for prognosis of periodontal healing of infrabony defects: two different definitions of defect depth. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 75, n. 3, p. 399-407, Mar. 2004.

GALVÃO, M. P. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 56-62, Feb. 2003.

GAPSKI, R. et al. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 75, n. 3, p. 441-452, Mar. 2004.

GASPERSIC, R. et al. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF- alpha on ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 198-203, Apr. 2003.

HARREL, S. K. Occlusal forces as a risk factor for periodontal disease, **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 32, p. 111-117, 2003.

HARREL, S. K.; NUNN, M. E. The effect of occlusal discrepancies on periodontitis.II. Relationship of occlusal treatment to the progression of periodontal disease. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 72, n. 4, p. 495-505, Apr. 2001.

HINRICHS, J. E. O papel do calculo dental e outros fatores predisponentes, In: CARRANZA, N. T. (Org.). **Carranza Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 162-181.

KARIMBUX, N. Y. et al. The expression of collagen I and XII mRNAs in porphyromonas gingivalis – induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 69, n. 1, p. 34-40, Jan. 1998.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 25, p. 8-20, 2001.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 62, n. 1, p. 59-73, Jan. 1991.

KLAUSEN, B.; EVANS, R. T.; SFINTESCU, C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 97, n. 6, p. 494-499, Dec. 1989.

KUHR, A. et al. Observations on experimental periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 2, p. 101-106, Apr. 2004.

LEE, H-M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 75, n. 3, p. 453-463, Mar. 2004.

LINDHE, J.; NYMAN, S.; ERICSSON, I. Trauma de oclusão, In: LINDHE, J. (Org.). **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 193-206.

LU, L-H et al. Histological and histochemical quantification of root resorption incident to the application of intrusive force to rat molars. **Eur. J. Orthod.**, London, v. 21, n. 1, p. 57-63, Feb. 1999.

NOCIT JÚNIOR, H. F. et al. Histometric evaluation of the effects of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 36, n. 6, p. 361-366, Dec. 2001.

NOCITI JÚNIOR, H. F. et al. The influence of nicotine the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 71, n. 9, p. 1460-1464, Sept. 2000.

NOGUEIRA-FILHO, G. R. et al. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 75, n. 3, p. 348-352, Mar. 2004.

NUNN, M. E.; HARREL, S. K. The effect of occlusal discrepancies on periodontitis.I. Relationship of initial occlusal discrepancies to initial clinical parameters. **J. Periodontol.**, Birmingham, v. 72, n. 4, p. 485-494, Apr. 2001.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 24, p. 239-252, Oct. 2000.

PRESHAW, P. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 9, p. 697-707, Sept. 2004.

RICARDO, L. H. **Estudo comparativo da utilização local de tetraciclina, minociclina e ácido cítrico como adjuntos à instrumentação periodontal: análise histológica e histomorfométrica em ratos.** 2002 160f. Tese (Doutorado em Biopatologia bucal)- Departamento de Odontologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José dos Campos, 2002.

RYAN, M. E.; RAMAMURTHY, N. S.; GOLUB, L. M. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. **Curr. Opin. Periodontol.**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 85-96, 1996.

SALVI, G. E.; LANG, N. P. Host response modulation in the management of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Birmingham, v. 32, p. 108-129, 2005, (suppl.6).

## ANEXO A

Cavallini, Fabiana

A influência de dose subantimicrobiana de doxiciclina sobre a perda óssea alveolar e a inserção conjuntiva em periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal em ratas / Fabiana Cavallini. - 2006.

68f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2006.

Orientação: Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo, Departamento de Odontologia.

1. Dose subantimicrobiana de doxiciclina. 2. Sobrecarga oclusal. 3. Periodontite experimental. I. Título.

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.  
Fabiana Cavallini  
Taubaté, junho de 2006.