

**CELSO MARTINS QUEIROZ JUNIOR**

Orientação: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

# **EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA E LOCAL DE INIBIDORES DE CICLOOXIGENASES NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS**

Laboratório de Inflamação e Dor  
Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Celso Martins Queiroz Junior**

**Efeitos da administração sistêmica e local  
de inibidores de ciclooxigenases na  
doença periodontal experimental em  
ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Farmacologia.

**Orientadora:** Janetti Nogueira de Francischi.

Laboratório de Inflamação e Dor - Departamento de Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, Maio de 2008.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Apoio Financeiro:** CNPq, CAPES, FAPEMIG

“Quero conhecer os pensamentos de Deus, o resto é detalhe.”

Albert Einstein, 1879-1955

## **AGRADECIMENTOS**

“Por tudo o que tens feito  
Por tudo o que vais fazer  
Por T uas promessas e tudo o que T u és  
E u quero T e agradecer  
Com todo o meu ser.  
T e agradeço, meu Senhor!  
T e agradeço por me libertar e salvar  
Por ter morrido em meu lugar  
T e agradeço  
Jesus, T e agradeço  
E u T e agradeço!”

(*Dennis Jernigan. Versão: Ana P.V. Bessa*)

Todos os outros, de alguma forma, colocados em meu caminho, sintam-se abraçados e agraciados por mim. Família, orientadoras, professores, funcionários, colegas de laboratório, de classe, de vida, pessoas que conheço e que conhecerei: um obrigado e um abraço.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E QUADROS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 O periodonto .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 A doença periodontal .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Epidemiologia da DP .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Patogenia da DP .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Ciclooxygenases e prostaglandinas .....</b>	<b>22</b>
<b>1.6 Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) .....</b>	<b>23</b>
<b>1.7 Modelos de estudo da DP .....</b>	<b>26</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Geral .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>32</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Animais de experimentação .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Esterilização do material .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Anestesia dos animais .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Modelo de doença periodontal induzida por ligadura .....</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Processamento histológico .....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Análise morfométrica .....</b>	<b>37</b>

4.7 Administração das drogas .....	39
4.8 Drogas e reagentes .....	40
4.9 Análise estatística .....	41
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 Período crítico de intervenção farmacológica .....	43
5.2 Curvas dose-resposta de celecoxibe e efeito da administração do composto experimental SC236, e do inibidor não seletivo de COX, piroxicam, na DP experimental .....	47
5.3 Efeito da administração local de inibidores seletivos (celecoxibe e SC236) e não seletivos (indometacina e piroxicam) de COX-2 na DP experimental .....	52
5.4 Efeito da administração sistêmica e local do inibidor seletivo de COX-1, SC560, na DP experimental em ratos .....	56
5.5 Efeito da administração ipsi e contralateral de indometacina ou celecoxibe na DP experimental em ratos .....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
6.1 Os antiinflamatórios não esteroidais e a doença periodontal .....	65
6.2 Redução de prostaglandinas pelos AINEs <i>versus</i> mecanismos envolvidos na patogênese da doença periodontal .....	67
6.3 Outros efeitos benéficos da inibição de COX-2 para a resolução da inflamação periodontal .....	71
6.4 O envolvimento de COX-1 na doença periodontal experimental em ratos .....	72
6.5 Perspectivas para o uso local de fármacos na terapêutica da DP .....	74
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>8 ABSTRACT .....</b>	<b>79</b>

<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>FIGURA 1</b>	Esquema das principais estruturas dentárias e periodontais .....	16
<b>FIGURA 2</b>	Fotografia do rato anestesiado e posicionado na mesa experimental para o procedimento de colocação do fio de seda.....	36
<b>FIGURA 3</b>	Desenho esquemático de uma secção ântero-posterior de um segundo molar mostrando a posição da ligadura de seda ao redor do dente na região da junção cimento-esmalte .....	36
<b>FIGURA 4</b>	Fotomicrografias de corte histológicos de hemi-maxilas de ratos sem DP (A) e com DP (B).....	38
<b>QUADRO 1</b>	Classificação das doenças e condições periodontais. ....	18

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** A redução da doença periodontal em ratos depende do esquema terapêutico quando antiinflamatórios tradicionais ou *coxibes* são utilizados ..... 45
- GRÁFICO 2** A redução do recrutamento de leucócitos para a gengiva de ratos com periodontite não depende do esquema terapêutico quando antiinflamatórios tradicionais ou *coxibes* são utilizados..... 46
- GRÁFICO 3** Redução da perda de inserção periodontal após a administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e ao piroxicam (PIX) ..... 49
- GRÁFICO 4** Redução da perda da crista óssea após a administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e ao piroxicam (PIX) ..... 50
- GRÁFICO 5** Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparado ao composto experimental SC236 ou ao piroxicam (PIX) no número de leucócitos presentes na gengiva de ratos com periodontite ... 51
- GRÁFICO 6** Redução da perda de inserção periodontal após a administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX)..... 53
- GRÁFICO 7** Redução da perda da crista óssea alveolar após a administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX)..... 54
- GRÁFICO 8** Efeito da administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparado ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX), no número de leucócitos presentes na gengiva de ratos com periodontite ..... 55
- GRÁFICO 9** Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, nas perdas de inserção e da crista óssea alveolar em ratos com periodontite ..... 57

<b>GRÁFICO 10</b>	Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, na migração celular para a gengiva de ratos com periodontite .....	58
<b>GRÁFICO 11</b>	Efeito da administração local de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, nas perdas de inserção e da crista óssea alveolar em ratos com periodontite .....	59
<b>GRÁFICO 12</b>	Efeito da administração local de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, na migração celular para a gengiva de ratos com periodontite .....	60
<b>GRÁFICO 13</b>	Comparação entre a administração ipsi e contralateral de indometacina e celecoxibe nos indicadores da DP experimental .....	62
<b>GRÁFICO 14</b>	Comparação entre a administração ipsi e contralateral de indometacina e celecoxibe na migração celular para a gengiva de ratos com DP experimental .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AINE</b>	Antiinflamatório não esteroideal
<b>CO</b>	Crista óssea alveolar
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b><i>Coxibe</i></b>	Antiinflamatório não esteroideal seletivo de ciclooxigenase-2
<b>DP</b>	Doença periodontal
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>IP</b>	Inserção periodontal
<b>JCE</b>	Junção cimento-esmalte
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>LX</b>	Lipoxina
<b>µg</b>	Micrograma
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>RANKL</b>	Ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TX</b>	Tromboxano

## RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes desencadeada pelo acúmulo de bactérias anaeróbias Gram-negativo na região subgingival. Ela é caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos periodontais, que incluem ligamento periodontal e osso alveolar. A resposta do hospedeiro contra os microrganismos periodontopatogênicos é uma das maiores responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da DP. Inúmeros mediadores inflamatórios têm sido implicados nessa destruição, incluindo prostaglandinas e leucotrienos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração sistêmica e local de inibidores de ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), principais enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas, sobre a DP experimental em ratos. A DP foi induzida pela colocação de um fio de seda estéril na região cervical do 2º molar superior esquerdo. Os animais foram tratados do 3º ao 5º ou do 9º ao 11º dias após a indução da doença e sacrificados no 11º dia. Os indicadores de DP avaliados foram a perda de inserção periodontal, a perda da crista óssea alveolar e o número de leucócitos presentes na gengiva dos animais. Para a mensuração desses indicadores foi utilizada análise morfométrica de cortes histológicos de hemi-maxilas coradas por hematoxilina-eosina. Nossos resultados mostraram que existe um período crítico para a intervenção farmacológica na DP experimental utilizando-se antiinflamatórios tradicionais ou seletivos de COX-2. A administração sistêmica de indometacina, celecoxibe ou rofecoxibe impediu a progressão da doença apenas quando foi realizada entre o 3º e o 5º dia da DP, mas não entre o 9º e o 11º. A administração local dos inibidores seletivos e não seletivos de COX-2 reproduziu os efeitos da administração sistêmica. Indometacina, piroxicam, celecoxibe e SC236 reduziram a perda de inserção, a perda óssea e a migração celular para a gengiva de ratos com DP quando administrados na gengiva adjacente ao dente com a doença entre o 3º e o 5º dia experimental. Diferentemente dos antiinflamatórios tradicionais e seletivos de COX-2, a administração tanto sistêmica quanto local de um inibidor seletivo de COX-1, o composto SC560, reduziu apenas a perda de inserção periodontal e a migração celular, mas não a perda óssea. Concluimos, então, que as enzimas COX-1 e COX-2 estão envolvidas diferencialmente na patogênese da periodontite experimental em ratos. Como os inibidores de COX-2 se mostraram eficazes em limitar o desenvolvimento dos sinais da DP quando administrados

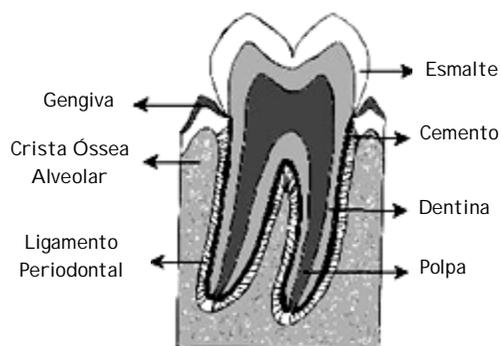
localmente, pode-se sugerir a utilização dessa via (local/tópica) como potencial alternativa terapêutica no tratamento dessa condição inflamatória crônica.

# Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *O periodonto*

O periodonto é constituído pelas estruturas que participam da sustentação dos dentes na cavidade bucal, sendo didaticamente dividido em duas partes: a primeira, formada pelo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, e a segunda pela gengiva (Figura 1). As primeiras estruturas são responsáveis pela ancoragem dos dentes nos alvéolos, formando o periodonto de inserção ou de sustentação. A gengiva, por sua vez, recobre a crista óssea alveolar e estabelece a continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente por meio do epitélio juncional. Por isso, ela é denominada periodonto marginal ou de proteção (Ten Cate *et al.*, 1998).



**Figura 1:** Esquema das principais estruturas dentárias e periodontais.

Cada uma das estruturas que compõe o periodonto exerce função específica. A gengiva origina o sulco gengival, um espaço entre o epitélio do sulco e o dente. No sulco gengival está presente um fluido tecidual (fluido crevicular) que passa através do epitélio juncional e contém, além de células epiteliais descamadas, neutrófilos que funcionam como primeira linha de defesa periodontal. O ligamento periodontal, tecido conjuntivo frouxo situado entre cimento e osso alveolar, tem a importante função de

receptor sensorial indispensável ao posicionamento adequado dos maxilares durante a mastigação e também no estado de repouso. Por sua vez, o cemento, um tecido conjuntivo duro muito semelhante ao osso, cobre as raízes dos dentes e tem como principal função a inserção das fibras do ligamento periodontal ao dente. O osso alveolar é uma estrutura muito mineralizada e que sofre constantes mudanças para se adaptar às diversas formas de tensão a que é submetido. Ele também proporciona inserção para os feixes de fibras do ligamento, além de formar os alvéolos que contêm os dentes (Ten Cate *et al.*, 1998).

### 1.2 A doença periodontal

A atual classificação das doenças e condições que afetam os tecidos periodontais é baseada no mais recente e internacionalmente divulgado consenso de opiniões entre especialistas da área. Ela foi apresentada e discutida em 1999 no *Workshop Internacional para a Classificação das Doenças Periodontais*, organizado pela *American Academy of Periodontology* (Academia Americana de Periodontologia - AAP) (Quadro 1) (Wiebe & Putnins, 2000).

**Quadro1:** Classificação das doenças e condições periodontais.

Classificação das Doenças e Condições Periodontais	Observações
<i>Doenças Gengivais</i> Induzidas por placa Não-induzidas por placa	As doenças gengivais podem ocorrer em um periodonto sem perda de inserção ou em um periodonto com perda de inserção estabilizada e não-progressiva.
<i>Periodontite Crônica</i> Localizada ou Generalizada	
<i>Periodontite Agressiva</i> Localizada ou Generalizada	A periodontite agressiva também pode ser classificada baseando-se em sua extensão e intensidade. De forma geral, a extensão pode ser caracterizada como localizada
<i>Periodontite como Manifestação de Doenças Sistêmicas</i>	(<30% de áreas envolvidas) ou generalizada (>30% de áreas envolvidas).
<i>Doenças Periodontais Necrosantes</i> Gengivite ulcerativa necrosante Periodontite ulcerativa necrosante	A intensidade pode ser caracterizada baseando-se na quantidade de perda de inserção clínica (PIC): leve = 1 ou 2 mm
<i>Abscessos do Periodonto</i>	PIC; moderada = 3 ou 4 mm PIC; e
<i>Periodontite Associada a Lesões Endodônticas</i>	avançada $\geq$ 5 mm PIC.
<i>Deformidades e Condições de Desenvolvimento ou Adquiridas</i>	

Apesar das inúmeras classificações de doenças e condições periodontais propostas pela AAP, sabe-se que são as características da periodontite crônica que marcam esse grupo de doenças: processos inflamatórios geralmente crônicos que, na ausência de tratamento, podem evoluir até a perda dos dentes (Wiebe & Putnins, 2000).

Deste modo, a doença periodontal (DP) pode ser definida como uma condição inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes que atinge sítios únicos ou múltiplos dentro da cavidade oral. Essencialmente, é uma doença infecciosa desencadeada pelo

acúmulo de bactérias anaeróbias Gram-negativo na região subgengival. Caracteriza-se pela destruição progressiva dos tecidos periodontais, que incluem ligamento periodontal e osso alveolar, com a formação de bolsa periodontal, retração gengival ou ambas (Page, 1991; Page *et al.*, 1997).

A característica clínica que difere a periodontite de um processo inflamatório inicial do tecido gengival - a gengivite - é a presença da perda de inserção clinicamente detectável. Essa característica é frequentemente acompanhada por mudanças na densidade e altura do osso alveolar subjacente. Os sinais clínicos de inflamação como alterações na coloração, contorno, consistência e sangramento à sondagem gengival podem não ser sempre indicativos da progressão da perda de inserção. Entretanto, a presença contínua de sangramento à sondagem em exames clínicos seqüenciais é um indicador da presença de inflamação e do potencial para uma perda subsequente de inserção na área com sangramento. A perda de inserção associada à periodontite pode progredir tanto continuamente como em surtos episódicos de atividade da doença (Page, 1991; Page *et al.*, 1997).

### 1.3 Epidemiologia da DP

Estudos epidemiológicos provenientes de diversas partes do mundo mostraram que uma grande porcentagem da população adulta é significativamente afetada por periodontite. A DP é responsável pela maioria das perdas dentárias em países desenvolvidos (Albandar, 2005). A periodontite agressiva é caracterizada por uma perda rápida e intensa dos tecidos periodontais e acomete, predominantemente, adolescentes e adultos jovens. Ela é prevalente entre as populações latino-americanas e de descendência africana, sendo menos comum entre os caucasianos. De maneira diferente, a periodontite crônica é uma doença comumente encontrada entre pessoas de diferentes

faixas etárias. Apesar disso, ela é prevalente entre a população idosa em todas as partes do mundo (Albandar, 2005; Van Der Velden, 1984). Aproximadamente 48% dos norte-americanos adultos têm periodontite crônica e valores similares ou maiores que esse já foram relatados em outras populações (Albandar, 2005).

O impacto que a DP tem nas populações se deve não só à perda dos dentes, o que prejudica todo o sistema estomatognático. Atualmente, tem sido levantada a possibilidade de que indivíduos com DP podem apresentar risco aumentado para várias condições patológicas sistêmicas. Evidências sugerem que pessoas com DP avançada podem ser até duas vezes mais susceptíveis a doenças cardiovasculares do que pessoas sem DP (Paquette, 2004). Infecções orais maternas como a DP também podem constituir fatores de risco para complicações na gravidez, tais como nascimento de bebês prematuros ou com baixo peso (Madianos *et al.*, 2002).

Tanto a periodontite crônica quanto a agressiva são doenças de origem multifatorial. Apesar de serem causadas primariamente por microrganismos da placa dental, diversas condições locais ou externas exercem efeitos modificadores em sua progressão (Albandar, 2005). Assim, a susceptibilidade à DP pode estar associada tanto a fatores genéticos (Michalowicz, 1994) como ambientais, tais como aumento da idade (Hugoson & Jordan, 1982; Burt, 1994; Mochizuki *et al.*, 1999), experiências negativas durante a vida, em especial aquelas manifestadas como depressão (Monteiro da Silva *et al.*, 1996; Genco *et al.*, 1998b), tabagismo (Gonzales *et al.*, 1996) e deficiência de insulina (Dennison *et al.*, 1996).

#### 1.4 Patogenia da DP

A doença periodontal apresenta etiologia bacteriana com padrão complexo, existindo uma variedade de microrganismos responsáveis por seu início e outros por sua

progressão. Apesar de mais de quatrocentas espécies diferentes de bactérias já terem sido detectadas na cavidade oral, apenas um número limitado tem sido implicado como patógeno periodontal. Muitos desses organismos podem estar presentes em indivíduos periodontalmente saudáveis e podem existir em uma harmonia comensal com o hospedeiro (Moore & Moore, 1994; Nonnenmacher *et al.*, 2001). Sendo assim, embora a DP tenha agentes etiológicos já identificados em estudos anteriores, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a resposta do hospedeiro a esses microrganismos periodontopatogênicos desempenha o papel mais importante no desenvolvimento da doença (Genco *et al.*, 1998a, Paquete & Williams, 2000).

As bactérias presentes nos tecidos subgengivais desencadeiam uma resposta inflamatória no hospedeiro que causa a maioria da destruição tecidual (Genco *et al.*, 1998a). Diversas células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e mastócitos migram para o periodonto em resposta ao estímulo bacteriano na tentativa de eliminar o agente agressor. De fato, tanto as células recrutadas quanto células residentes liberam mediadores que contribuem para a destruição dos tecidos periodontais. Um dos mecanismos considerado responsável pela destruição periodontal é a lesão tecidual induzida pelo acúmulo de grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que liberam enzimas proteolíticas e metabólitos reativos de oxigênio durante sua fagocitose e degranulação. Em outras palavras, pode-se dizer que a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro é que irá determinar o perfil de destruição da DP (Lee *et al.*, 1995; Chapple, 1997; Lohinai *et al.*, 1998).

No decorrer da DP, com o aumento crescente do número de bactérias e conseqüentemente dos seus produtos destrutivos, ocorre uma interação dessas com o epitélio gengival, que induz a expressão de moléculas de adesão celular e a liberação de

diversos mediadores inflamatórios. Dentre esses, os metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides), tais como leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PG), estão entre os mais importantes (Offenbacher *et al.*, 1986). Muitos dos eventos patológicos que ocorrem na DP podem ser explicados pela atividade desses mediadores lipídicos.

### 1.5 *Ciclooxigenases e prostaglandinas*

Diversos estímulos como lesões celulares ou interações com bactérias podem ativar enzimas celulares como a fosfolipase A<sub>2</sub> e fosfolipase C. Elas são capazes de clivar fosfolipídeos de membrana liberando o ácido araquidônico (ácido eicosa-tetra-enóico) um ácido graxo poli-insaturado constituinte da membrana celular. O ácido araquidônico é passível, então, de sofrer ação das enzimas ciclooxigenases (COXs) formando os mediadores prostanóides, como as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (Smith *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1998).

Já foram identificadas três isoformas de ciclooxigenase: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A primeira, constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, é responsável pela produção de níveis fisiológicos de prostaglandinas. Ela é responsável, por exemplo, pela citoproteção gástrica. A segunda isoforma tem sua expressão aumentada durante reações inflamatórias, apesar de já ter sido descrita como constitutiva em órgãos como os rins (Smith *et al.*, 1996; Vane *et al.*, 1998). Em relação à COX-3, há controvérsias na literatura sobre sua real importância para o desenvolvimento das respostas inflamatórias. Existem hipóteses de que ela seja importante em funções cerebrais podendo, assim, explicar a ação analgésica e antipirética de drogas como o paracetamol (Chandrasekhran *et al.*, 2002; Mitchell & Warner, 2006). Outros trabalhos, entretanto, já descartaram a possibilidade de que a COX-3 tenha relevância clínica para os mecanismos de febre e dor (Kis *et al.*, 2005).

Em eventos inflamatórios, a produção local de prostanóides como a PGE<sub>2</sub> pode sensibilizar as terminações nervosas de fibras aferentes nociceptivas, reduzindo o limiar para a deflagração do impulso associado à resposta dolorosa. Esses mediadores lipídicos também podem aumentar o fluxo sanguíneo local causando eritema e potencializando a ação de outros mediadores inflamatórios. PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> são vasodilatadoras por si próprias, mas não aumentam diretamente a permeabilidade vascular ou causam dor declarada. Para isso, elas atuam de modo sinérgico com outros mediadores inflamatórios como histamina e bradicinina. As prostaglandinas também estão implicadas na produção de febre (Smith *et al.*, 1996; Vane, 1971; Vane *et al.*, 1998).

Na DP, já foi encontrado que homogenatos de tecidos periodontais inflamados apresentam um aumento na capacidade de sintetizar prostaglandinas quando comparados a homogenatos de tecidos periodontais sadios (ElAttar *et al.*, 1984). Isso sugere que, durante a inflamação periodontal, ocorre atividade aumentada da COX devido à maior expressão da isoforma COX-2. Sabe-se que a PGE<sub>2</sub> é um potente estimulador da reabsorção óssea, um dos sinais patognomônicos da DP, e já foi mostrado um aumento dos níveis de PGE<sub>2</sub> no fluido crevicular de pacientes acometidos pela doença quando comparado ao de pacientes saudáveis. Além disso, as variações nos níveis de PGs mostraram servir como indicadoras da gravidade da DP (Pouliot *et al.*, 2000). Sendo assim, a inibição da produção desses mediadores inflamatórios poderia constituir um potencial alvo terapêutico no tratamento da DP.

### 1.6 Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

Relatos que datam de mais de três mil anos sugerem que substâncias com efeitos similares aos dos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) já eram usadas para aliviar as dores das pessoas mesmo nos tempos anteriores a Cristo. Atualmente, os

AINEs estão entre as drogas mais prescritas do mundo. O protótipo do grupo, o ácido acetil salicílico (AAS), foi um dos primeiros fármacos a serem comercializados, desde 1897, e apresenta um grande impacto terapêutico até os dias de hoje (Mitchell & Warner, 2006).

Os AINEs são fármacos que atuam ao inibirem as enzimas ciclooxigenases (COXs), as quais catalisam o passo limitante da síntese dos mediadores inflamatórios lipídicos derivados do ácido araquidônico. Deste modo, ocorre redução da síntese de prostanóides como a PGE<sub>2</sub>, o que explica os efeitos antiinflamatórios dessa classe de drogas (Vane, 1971). Da mesma maneira, a toxicidade gastrointestinal provocada pelo uso prolongado de altas doses de AINEs é explicada pela diminuição dos níveis de PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> produzidas constitutivamente por COX-1 e relacionadas com a citoproteção gástrica. A inibição da formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) também justifica o efeito de inibição da agregação plaquetária inerente ao AAS (Mitchell & Warner, 2006).

Na tentativa de diminuir os efeitos adversos associados à inibição não seletiva das COXs pelos AINEs tradicionais, principalmente os efeitos gastrointestinais decorrentes da inibição da COX-1 constitutiva, surgiram, na década de 90, os novos AINEs ou *coxibes*, inibidores seletivos de COX-2. Esses fármacos apresentam boa margem de segurança em relação à sua toxicidade gastrointestinal. Além disso, comprovou-se, à semelhança dos AINEs tradicionais, a sua atividade analgésica em processos inflamatórios agudos e crônicos (Francischi *et al.*, 2002; Baraf, 2007), inibição da migração celular induzida experimentalmente (Maltos *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2005), bem como potenciais aplicações terapêuticas na redução do crescimento de tumores (Han *et al.*, 2004).

No entanto, junto à explosão do uso dos *coxibes* pela população mundial, surgiram os primeiros relatos de importantes efeitos cardiovasculares adversos associados ao uso crônico dessas drogas (Mitchell & Warner, 2006). A redução dos níveis de PGI<sub>2</sub> (vasodilatador e antiagregante plaquetário) pela inibição da COX-2 expressa nas células endoteliais e a mínima interferência na produção de TXA<sub>2</sub> (vasoconstritor e pró-agregante plaquetário) pelas plaquetas, que só expressam COX-1, parecem promover um desequilíbrio no processo trombogênico. Isso foi observado como um aumento no risco de ocorrência de trombose vascular e infarto agudo do miocárdio em pacientes usuários crônicos dos *coxibes* (Jüni *et al.*, 2004).

Terapias usando tanto os inibidores seletivos de COX-2 quanto AINEs tradicionais foram capazes de modificar a progressão da DP em modelos animais e em humanos. O uso dos AINEs no contexto da DP tem confirmado o envolvimento dos mediadores lipídicos, pelo menos aqueles derivados da via das ciclooxigenases, na patogênese de tal doença (Holzhausen *et al.*, 2002; Salvi & Lang, 2005).

Em um modelo de DP experimental em ratos, Bezerra *et al.* (2000) e Holzhausen *et al.* (2002) mostraram que a administração sistêmica de celecoxibe ou indometacina preveniu a perda óssea alveolar conforme avaliado através de uma lupa estereoscópica e radiografias, respectivamente. No entanto, o tratamento crônico com o composto não-seletivo indometacina induziu lesão gástrica intensa nos animais. Lohinai *et al.* (2001) mostraram que a administração de um inibidor seletivo de COX-2 (NS-398) em ratos com DP diminuiu o extravasamento de plasma no tecido gengival dos animais doentes.

Alguns trabalhos têm explorado o uso tópico de antiinflamatórios não-esteroidais no tratamento da DP, i.e. eles foram aplicados localmente no sítio com a doença. Tal tratamento apresenta vantagens em relação à administração sistêmica, uma vez que

doses menores são utilizadas. Isso previne ou, pelo menos, diminui os efeitos adversos amplamente conhecidos dos AINEs (Li *et al.*, 1996).

Todos esses dados sugerem a participação de COX-1 e/ou COX-2 na fisiopatologia da DP. No entanto, o papel de inibidores seletivos de COX-1 na DP experimental ainda é muito pouco estudado, bem como a investigação do efeito da administração local de inibidores seletivos de COX-1 e COX-2 em sítios com DP.

### 1.7 Modelos de estudo da DP

A DP humana apresenta alto grau de complexidade. Fatores como os inúmeros microrganismos que compõem a microbiota oral e interagem entre si, os diferentes tipos de respostas que as células do hospedeiro estabelecem a cada tipo de agressão e, até mesmo, as variáveis genéticas e ambientais dificultam a obtenção de um modelo animal que reproduza fielmente as características da doença observadas no homem. No entanto, modelos de estudo capazes de reproduzir aspectos bem definidos da doença como etiologia, o papel de fatores de virulência específicos, mecanismos de colonização, efeitos de células e mediadores inflamatórios nas respostas teciduais, bem como o papel de outras infecções e de fatores de risco do hospedeiro podem ser desenvolvidos (Genco *et al.*, 1998a).

Os roedores são animais usados em estudos de DP experimental e sua utilização apresenta diversas vantagens, tais como: são fáceis de manusear, apresentam baixo custo, têm características genéticas conhecidas, podem ser alimentados em condições *germ free* e apresentam sistema imune bem estudado (Genco *et al.*, 1998a).

Em modelos utilizando-se ratos, a DP pode se desenvolver por meio da própria microbiota dos animais, ou seja, com os microrganismos indígenas causando a doença (Garant & Cho, 1979) e também pela introdução experimental de microrganismos e/ou

seus produtos no sulco gengival ou cavidade bucal dos animais (Suzumura *et al.*, 1989). Além disso, a DP pode ser induzida com a colocação de um fio de seda ao redor da região cervical de um dos molares do rato, o que propicia o acúmulo de bactérias indígenas no sulco gengival e leva à destruição do periodonto. Esse modelo é simples de ser reproduzido, é bem estabelecido na literatura e possibilita que importantes parâmetros da doença possam ser avaliados (Lohinai *et al.*, 1998; Breivik *et al.*, 2001).

Apesar de a linhagem de ratos mais frequentemente utilizada para modelos experimentais de DP ser a Sprague-Dawley, outras linhagens também já foram utilizadas com sucesso e apresentaram um padrão de desenvolvimento dos sinais da DP muito semelhantes entre si. Pacheco *et al.* mostraram que animais de ambas as linhagens, Holtzman e Wistar, apresentaram perda de inserção periodontal significativa a partir do quinto dia após a colocação da ligadura, atingindo a perda máxima entre 11 e 14 dias, que se manteve constante até o 28<sup>o</sup> dia de observação. O mesmo perfil de perda dos tecidos periodontais foi observado com a crista óssea alveolar, embora uma tendência de maior perda óssea em relação à perda de inserção tenha sido notada. Observou-se também um perfil de atividade semelhante no aumento no número total de células no tecido gengival das duas linhagens de ratos. Esse número teve seu pico no quinto dia, diminuiu a partir do 11<sup>o</sup> e manteve-se constante até o 28<sup>o</sup> dia de observação. A análise histológica revelou um infiltrado misto de polimorfo e mononucleares com predomínio de neutrófilos durante todo o período de observação (Pacheco *et al.*, 2007). Os ratos da linhagem Holtzman não se mostraram mais sensíveis à DP quando comparados aos da linhagem Wistar, ao contrário do que já foi observado em outros modelos experimentais, como o de hiperalgesia induzida por carragenina (Francischi *et al.*, 2002) ou o de resposta vascular e celular por inflamação em polpa dental (Maltos *et*

*al.*, 2004), em que a linhagem Holtzman foi mais sensível ao desenvolvimento de doenças inflamatórias.

No modelo experimental de DP induzida em ratos com uma ligadura, já foi descartada a possibilidade de que o procedimento de amarração do fio, e não apenas a sua presença, seria a causa da destruição dos tecidos periodontais. Para isso, um fio de seda foi fixado por amarração ao redor do segundo molar de ratos e imediatamente removido em dois grupos de animais, que foram acompanhados ou até o quinto dia, momento em que ocorreria o início das perdas periodontais, ou até o 11<sup>o</sup> dia após a colocação do fio, no pico da DP. Mostrou-se que em nenhum desses dois grupos experimentais ocorreu perda de inserção ou da crista óssea alveolar significativas. Além disso, o número total de células na gengiva ao redor do dente cuja ligadura foi imediatamente removida apresentou valores semelhantes aos de animais *naive*. Isso indicou que era a presença da ligadura e conseqüente acúmulo de microrganismos ao redor dela, e não um possível trauma da cirurgia de colocação do fio, a responsável pela indução da DP (Pacheco *et al.*, 2007).

# Justificativa

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença periodontal é uma das condições inflamatórias crônicas mais importantes na odontologia. Os fármacos antiinflamatórios não esteroidais seletivos para a enzima ciclooxigenase-2, os *coxibes*, surgiram como possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças crônicas por apresentarem menos efeitos adversos, i.e. gastrintestinais, que os AINEs não seletivos (Baraf, 2007; Chan *et al.*, 1999; Fitzgerald & Patrono, 2001; Whittle, 2003).

Considerando-se que a patogênese da DP não é completamente compreendida, e que o seu tratamento farmacológico ainda precisa ser melhorado, seria pertinente avaliar o efeito dos inibidores seletivos de COX-2 em seu desenvolvimento. Essas drogas já se mostraram potentes analgésicos no modelo de hiperalgisia induzida pela carragenina na pata de ratos (Francischi *et al.*, 2002) e antiinflamatórias no modelo de migração celular induzida por lipopolissacarídeo (LPS) na cavidade peritoneal de ratos (Menezes *et al.*, 2005).

Apesar de haver algumas evidências da participação dos mediadores inflamatórios lipídicos na progressão da DP, ainda existem poucas informações na literatura sobre o efeito dos *coxibes* em relação ao seu período crítico de intervenção farmacológica, bem como aos efeitos decorrentes da sua administração local na DP. O efeito da administração de inibidores seletivos de COX-1 na DP experimental em ratos também é pouco explorado.

# Objetivos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Geral*

Avaliar o efeito da administração de inibidores seletivos e não seletivos de ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) na perda óssea, perda de inserção periodontal e migração celular na doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

#### 3.2 *Específicos*

\* Verificar o período crítico para a intervenção farmacológica na DP experimental em ratos, utilizando diferentes esquemas terapêuticos.

\* Construir curvas dose-resposta para os sinais da DP experimental utilizando três inibidores seletivos de COX-2 - celecoxibe, rofecoxibe e o composto experimental SC236.

\* Estudar o efeito da administração do inibidor seletivo de COX-1 – SC560 – nos sinais da DP experimental em ratos.

\* Utilizar a indometacina e o piroxicam como padrões de drogas não-seletivas sobre as ciclooxigenases (antiinflamatórios tradicionais) no mesmo modelo experimental.

\* Comparar o desenvolvimento da DP quando os fármacos são utilizados em diferentes vias de administração, sistêmica ou local.

# Metodologia

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 *Animais de experimentação*

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) sob o protocolo de número 066/07 (Anexo I).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Holtzman, pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas suspensas, individualmente, com alimentação *ad libitum*, em uma sala com temperatura controlada (22 a 24 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

### 4.2 *Esterilização do material*

Todo o material e instrumental utilizado para a colocação da ligadura foi esterilizado em autoclave (121 °C) por um período de 30 minutos. O fio a ser colocado ao redor do dente (seda 4.0 - Ethicon®) é fornecido estéril.

### 4.3 *Anestesia dos animais*

Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia geral, utilizando-se uma mistura de quetamina 10% (Dopalen®) e xilazina 2% (Anasedan®), nas doses de 90 e 15 mg/kg, respectivamente (0,1 ml / 100 g de peso do animal), administrada por via intramuscular (i.m.). Os animais foram acompanhados individualmente até que se recuperassem da anestesia quando, então, foram colocados em gaiolas individuais suspensas.

#### 4.4 Modelo de doença periodontal induzida por ligadura

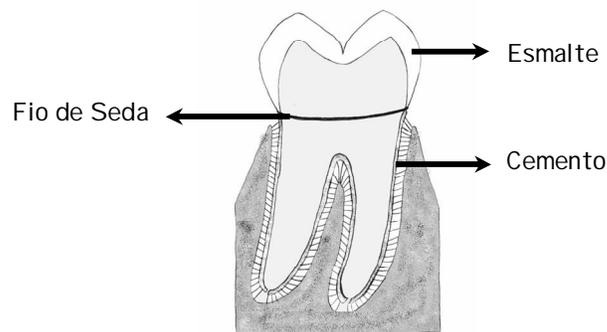
O modelo de estudo escolhido para o desenvolvimento deste trabalho é o de DP em ratos induzida por ligadura (Lohinai *et al.*, 1998; Breivik *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2007).

Após a anestesia geral, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa experimental, de modo a permitir uma adequada abertura bucal, bem como visualização e acesso aos molares superiores (Figura 2 A e B). Um fio (ligadura) de seda estéril (seda 4.0 - Ethicon®) foi, então, fixado por amarração ao redor da região cervical (junção cimento-esmalte) do segundo molar superior esquerdo (Figura 3) para possibilitar a retenção de microrganismos da própria microbiota do animal. O segundo molar do lado oposto não recebeu o fio e serviu como controle interno do experimento.

A eutanásia dos animais foi realizada com o uso de câmara de CO<sub>2</sub> seguida de decapitação no 11<sup>o</sup> dia após a realização da cirurgia. As maxilas foram removidas, fixadas em formol 10% tamponado (pH=7,2; 48 horas), para posterior processamento histológico e análise morfométrica.



**Figura 2:** Fotografia do rato anestesiado e posicionado na mesa experimental para o procedimento de colocação do fio de seda (A). Em B, detalhe da ligadura posicionada e fixada ao redor da região do segundo molar superior esquerdo.



**Figura 3:** Desenho esquemático de uma secção ântero-posterior de um segundo molar mostrando a posição da ligadura de seda ao redor do dente na região da junção cimento-esmalte.

#### 4.5 *Processamento histológico*

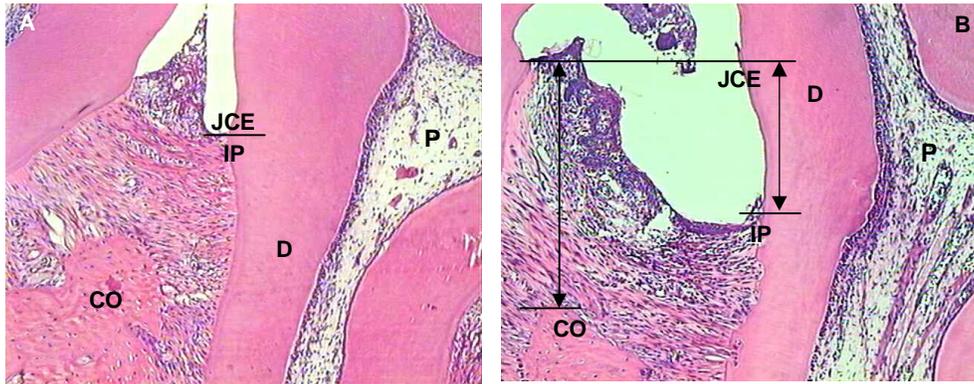
As maxilas excisadas foram fixadas em formol 10% tamponado, lavadas em água destilada, desmineralizadas em solução de EDTA 10% (período médio de 30 dias com trocas da solução a cada três dias), lavadas em água corrente (24 horas), desidratadas em álcoois de concentração crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%); diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados longitudinalmente em uma direção mesio-distal com espessura de 4  $\mu$ m, corados pela

técnica de hematoxilina e eosina (H & E) e montados em lâminas. Um estudo preliminar em nosso laboratório mostrou que não existem diferenças significativas entre as secções de maxilas realizadas até aproximadamente 20 µm antes ou depois do centro do dente. Sendo assim, o corte escolhido para análise foi aquele em que a porção mais central do dente podia ser observada, ou seja, aquele em que a polpa do segundo molar era vista em sua maior amplitude.

#### 4.6 Análise morfométrica

##### \* Avaliação da perda óssea e perda de inserção periodontal

A análise das lâminas foi realizada com o emprego de microscópio de luz e de morfometria digital. As imagens, com aumento de 10x, obtidas por uma microcâmara JVC TK-1270/RGB acoplada ao microscópio em um aumento capaz de distinguir a junção cimento-esmalte (JCE), a inserção periodontal (IP) e a crista óssea alveolar (CO) foram analisadas por meio do *software* KS300 contido no analisador de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss® (Maltos *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2007). A mensuração da perda óssea e da perda de inserção periodontal foi obtida, respectivamente, pela diferença das distâncias JCE-CO e JCE-IP entre o lado que recebeu a ligadura e o lado não-ligado, conforme mostrado na figura 4, e expressas em milímetros (mm). As análises foram realizadas por um experimentador que desconhecia os tratamentos a que os animais haviam sido submetidos.



**Figura 4:** Fotomicrografias de corte histológicos de hemi-maxilas de ratos saudáveis (A) e com DP (B). As distâncias entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção periodontal (IP) e entre a JCE e a crista óssea alveolar (CO) em um dente que recebeu a ligadura são mostradas pelos limites entre as setas. D (Dentina); P (Polpa). Aumento de 10x.

#### \* Contagem de células

A contagem do número total de células no tecido conjuntivo da gengiva adjacente e vestibular ao dente que recebeu a ligadura e ao dente controle foi realizada pelo mesmo *software* utilizado para a realização das medidas de perdas óssea e de inserção periodontal. Para a análise das células, um conjunto de algoritmos para execução automática (Macro) foi elaborado para captura (aumento: 40x), processamento e segmentação da imagem, definição das condições morfométricas e contagem de todos os núcleos das células contidas em cada imagem. Técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para realçar o núcleo das células do citoplasma e de outras estruturas presentes no corte histológico, tais como vasos sanguíneos e espaço extracelular, permitindo a criação de uma imagem binária contendo essas duas localizações: o núcleo das células e o espaço extracelular. Os núcleos dos tipos de células geralmente encontrados na gengiva e os núcleos dos leucócitos migrados foram,

então, contados por intermédio da seleção dos *pixels*. O total de células presentes no tecido conjuntivo da gengiva de cada animal foi obtido pela somatória das células contadas em seis diferentes imagens, e comparado à somatória das células contadas em amostras de gengiva de animais *naive*. Os resultados foram, então, apresentados como o número aproximado de leucócitos, correspondente à diferença entre o número células de animais experimentais e o número de células de animais *naive* (Maltos *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2007). Assim como para a mensuração da perda óssea e de inserção periodontal, a contagem das células foi realizada por um experimentador que desconhecia a natureza das amostras.

Todos os trabalhos de morfometria digital foram realizados no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do professor Marcelo Vidigal Caliarí.

#### 4.7 Administração das drogas

Todos os esquemas terapêuticos foram realizados no período matutino e a eutanásia dos animais, independentemente do período de intervenção farmacológica (no início ou no pico da DP), foi realizada no 11<sup>o</sup> dia após a colocação do fio no início da tarde. Após a cirurgia de colocação do fio ao redor do segundo molar superior esquerdo os diferentes grupos de animais foram tratados da seguinte maneira:

\* Administração sistêmica (via subcutânea – s.c.)

No 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias (início da DP) após a colocação do fio: indometacina (2 mg kg<sup>-1</sup>), celecoxibe (12 mg kg<sup>-1</sup>) ou rofecoxibe (0,7 mg kg<sup>-1</sup>).

No 9<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dias (pico da DP) após a cirurgia: indometacina (2 mg kg<sup>-1</sup>), celecoxibe (12 mg kg<sup>-1</sup>) ou rofecoxibe (0,7 mg kg<sup>-1</sup>).

Após avaliação das respostas obtidas com os diferentes protocolos acima descritos, foi realizada a escolha do período crítico de intervenção farmacológica para posterior administração (s.c.) de outras doses de celecoxibe (3-30 mg kg<sup>-1</sup>), de piroxicam (3 mg kg<sup>-1</sup>) ou dos compostos experimentais inibidores seletivos de COX-2 - SC236 (12 mg kg<sup>-1</sup>) - e de COX-1 - SC560 (0,5-5 mg kg<sup>-1</sup>) no período escolhido (no início ou pico da DP). A administração sistêmica de todos os compostos obedeceu à proporção de 0,1 ml/100 g de peso dos animais.

\* Administração local (injeção no fundo de saco do vestíbulo)

Para este protocolo, os animais foram submetidos à anestesia geral conforme descrito anteriormente.

A administração local (paraperióstea) ipsi ou contralateral (gengiva adjacente ao dente ligado ou ao dente do lado oposto, respectivamente) foi realizada no período de intervenção farmacológica escolhido e as seguintes drogas foram utilizadas: indometacina (100 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), piroxicam (100 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), celecoxibe (60, 120 ou 240 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), SC236 (120 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) ou SC560 (100 ou 300 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) (Francischi *et al.*, 2002).

Os grupos controle receberam salina (NaCl 0,9%) ou o veículo utilizado para a diluição dos fármacos (Tris, pH=8,2 – para indometacina – e etanol, salina fisiológica e tween 85, proporção 10:85:5 – para SC560 e SC236) nos mesmos dias e através das mesmas vias de administração que os grupos experimentais. As administrações locais foram realizadas com o volume de 0,1 ml/sítio.

#### 4.8 Drogas e reagentes

Indometacina (Sigma Chemical Co., EUA) foi diluída em solução tampão Tris (0,1 M, pH=8,2). Piroxicam (Feldene®, Pfizer, Brasil) foi diluído em solução salina

estéril (NaCl 0,9%). Celecoxibe (Celebra®, Searle & Co., Porto Rico) e rofecoxibe (Vioxx®, Merck Sharp & Dohme, México), inibidores seletivos de COX-2, foram dissolvidos em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Os compostos experimentais SC236 (4- [5- (4- Chlorophenyl)-3- (trifluoromethyl)-1 *H*-pyrazol-1- yl]benzenesulfonamide) e SC560 (5- (4- Chlorophenyl)-1- (4-methoxyphenyl)-3- trifluoromethyl pyrazole), inibidores seletivos de COX-2 e COX-1, respectivamente, foram diluídos em etanol, salina e Tween 85 (10:85:5, respectivamente). SC236 foi obtido da Searle & Co. (Porto Rico) e SC560 da Sigma Chemical Co. (EUA). Etanol, xilol, formaldeído, EDTA, parafina e hematoxilina foram obtidos da Synth (Brasil) e eosina da Vetec (Brasil).

#### 4.9 *Análise estatística*

Os resultados de perda de inserção, de crista óssea alveolar e do número de células foram apresentados como a média (em mm ou em número de células) ± erro padrão da média (EPM), sendo comparadas as diferenças entre as médias dos animais teste e seus respectivos controles. Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$  (*GraphPad Prism Software*, versão 2.01). Cada grupo experimental foi constituído por cinco animais ( $n=5$ ), exceto quando diferentemente indicado no texto.

# Resultados

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Período crítico de intervenção farmacológica*

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que não existe um período crítico para a intervenção farmacológica com o uso de opióides na DP. A administração de morfina tanto no período inicial quanto no pico da doença impede a progressão dos sinais da DP, apesar de não diminuir a migração celular (Pacheco *et al.*, 2007).

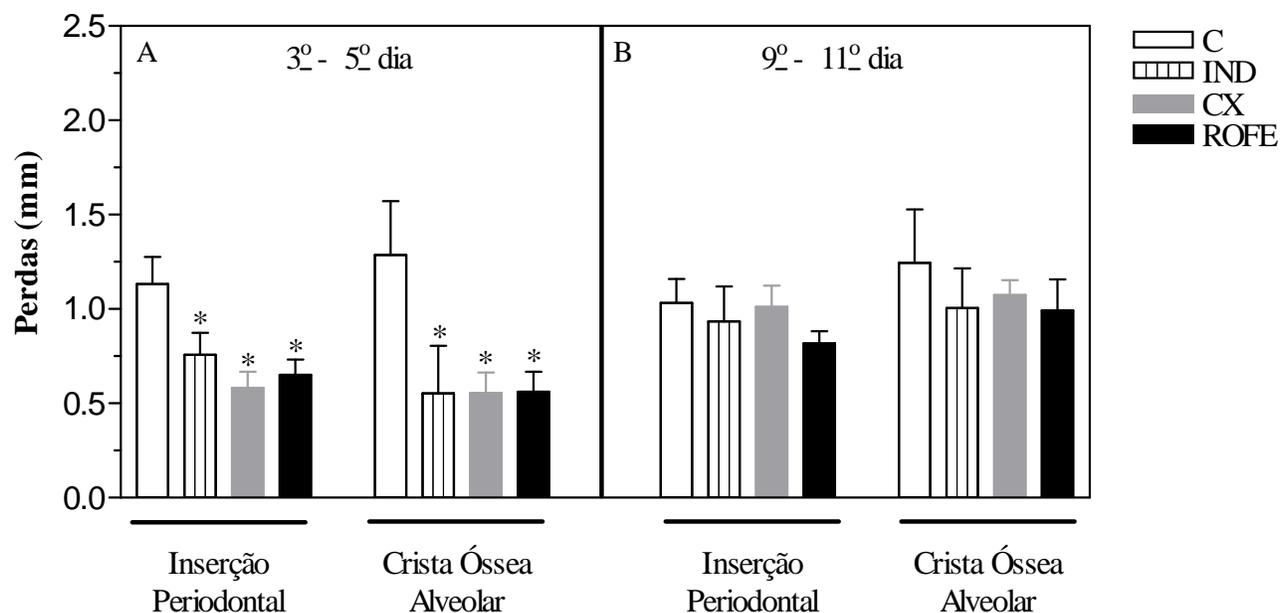
No presente trabalho, avaliamos essa relação temporal de administração das drogas *versus* efeitos observados. Doses conhecidamente eficazes de antiinflamatórios não esteroidais seletivos de COX-2 (celecoxibe e rofecoxibe) e do inibidor padrão não seletivo de COX, indometacina, foram administradas (s.c.) em animais com DP no início (3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio) ou no pico (9<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dias após a cirurgia) da doença.

A administração de 2 mg kg<sup>-1</sup> de indometacina, 12 mg kg<sup>-1</sup> de celecoxibe ou 0,7 mg kg<sup>-1</sup> de rofecoxibe no início da DP diminuiu significativamente as perdas de inserção e da crista óssea alveolar (Gráfico 1 A). O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe, reduziu a perda de inserção periodontal em 49% e a perda da crista óssea alveolar em 58% em relação ao grupo controle. Essa inibição foi comparável à apresentada pela indometacina, 36% e 57%, respectivamente. Além disso, o tecido ósseo pareceu ser mais sensível ao tratamento com os AINEs tradicionais e *coxibes* que as fibras periodontais (Gráfico 1 A).

No entanto, quando os mesmos fármacos foram administrados próximo ao ápice da DP (9<sup>o</sup> - 11<sup>o</sup> dias) não houve reversão dos sinais característicos da doença, sendo observadas perdas dos tecidos periodontais semelhantes às de animais controle tratados com salina (Gráfico 1 B).

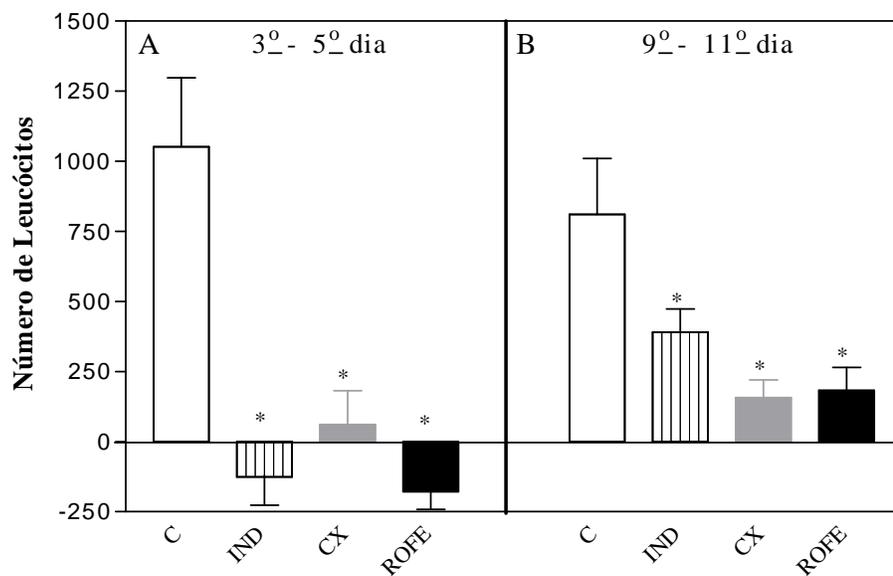
Ambos os esquemas experimentais reduziram efetivamente o recrutamento de células inflamatórias para o tecido gengival adjacente a dentes com periodontite (Gráfico 2). Essa redução do número de leucócitos foi maior com a administração inicial (Gráfico 2 A) do que com o tratamento dos animais no pico da DP (Gráfico 2 B) (apesar de esses valores não serem estatisticamente diferentes). Nos casos das administrações de indometacina e rofecoxibe do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia, observou-se que o número total de células presentes na gengiva dos animais desses grupos foi menor que o de animais *naive*, não-ligados, o que é indicado pelos valores negativos no Gráfico 2 A.

A partir desses resultados, todas as drogas utilizadas posteriormente foram administradas no início da DP (do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio), local ou sistemicamente, e os animais sacrificados no 11<sup>o</sup> dia da doença.



**Gráfico 1: A redução da doença periodontal em ratos depende do esquema terapêutico quando antiinflamatórios tradicionais ou *coxibes* são utilizados.**

Indometacina (IND), celecoxibe (CX) ou rofecoxibe (ROFE) foram administrados (s.c.) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> (painel A) ou do 9<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> (painel B) dia da doença. A DP foi induzida por ligadura no dia zero, os animais sacrificados no 11<sup>o</sup> dia e as medidas (mm) obtidas por morfometria digital a partir da avaliação de lâminas (H&E) dos 2<sup>os</sup> molares de animais controle (C) ou tratados com as drogas indicadas. \*  $p < 0,05$  usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto grupo C ( $n=6$ ).



**Gráfico 2: A redução do recrutamento de leucócitos para a gengiva de ratos com periodontite não depende do esquema terapêutico quando antiinflamatórios tradicionais ou *coxibes* são utilizados.** Indometacina (IND), celecoxibe (CX) ou rofecoxibe (ROFE) foram administrados (s.c.) do 3º ao 5º (painel A) ou do 9º ao 11º (painel B) dia da doença. A DP foi induzida por ligadura no dia zero, os animais sacrificados no 11º dia e a contagem de células obtida por morfometria digital a partir da avaliação de lâminas (H&E) da gengiva adjacente aos 2ºs molares de animais controle (C) ou tratados com as drogas indicadas. Os valores negativos para os grupos IND e ROFE indicam número de células menor que o observado em animais *naive*. \*  $p < 0,05$  usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto grupo C ( $n=6$ ).

5.2 *Curvas dose-resposta de celecoxibe e efeito da administração do composto experimental SC236, e do inibidor não seletivo de COX, piroxicam, na DP experimental*

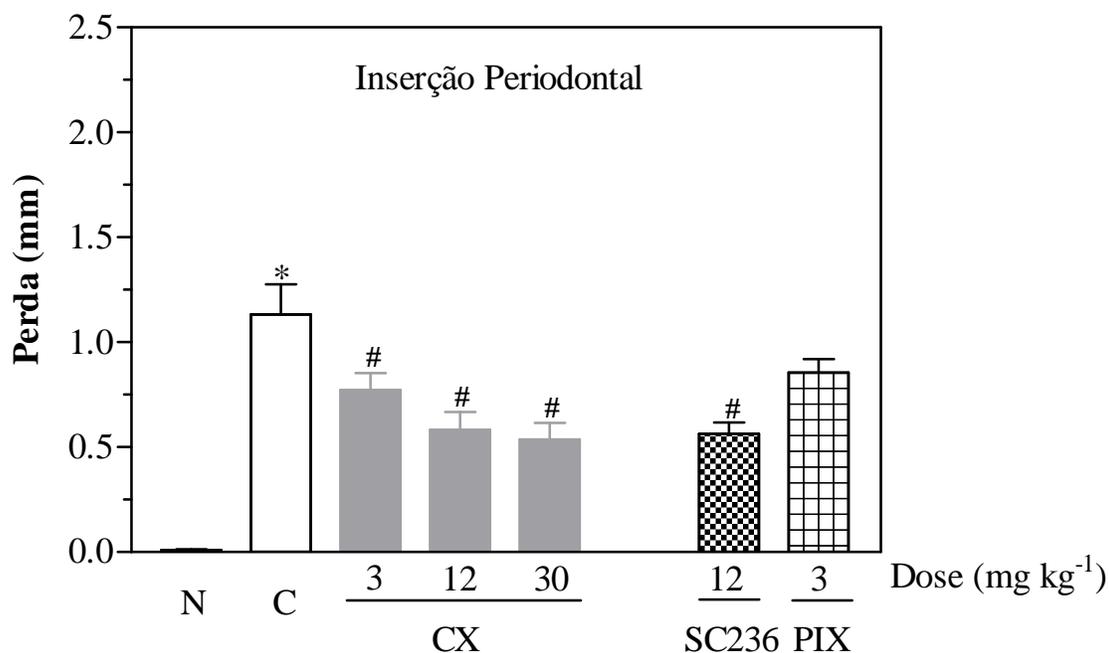
Animais que receberam (s.c.) diferentes doses de celecoxibe ( $3-30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após indução da DP apresentaram diminuição significativa e dose-dependente das perdas de inserção (32-53%) e da crista óssea alveolar (40-65%) (Gráficos 3 e 4).

Efeitos semelhantes foram observados na migração celular para a gengiva de ratos com DP. Todas as doses de celecoxibe utilizadas diminuíram significativamente o recrutamento celular. No entanto, a dose de  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  produziu a redução máxima visto que, com praticamente o triplo da dose, não ocorreu aumento do efeito (Gráfico 5).

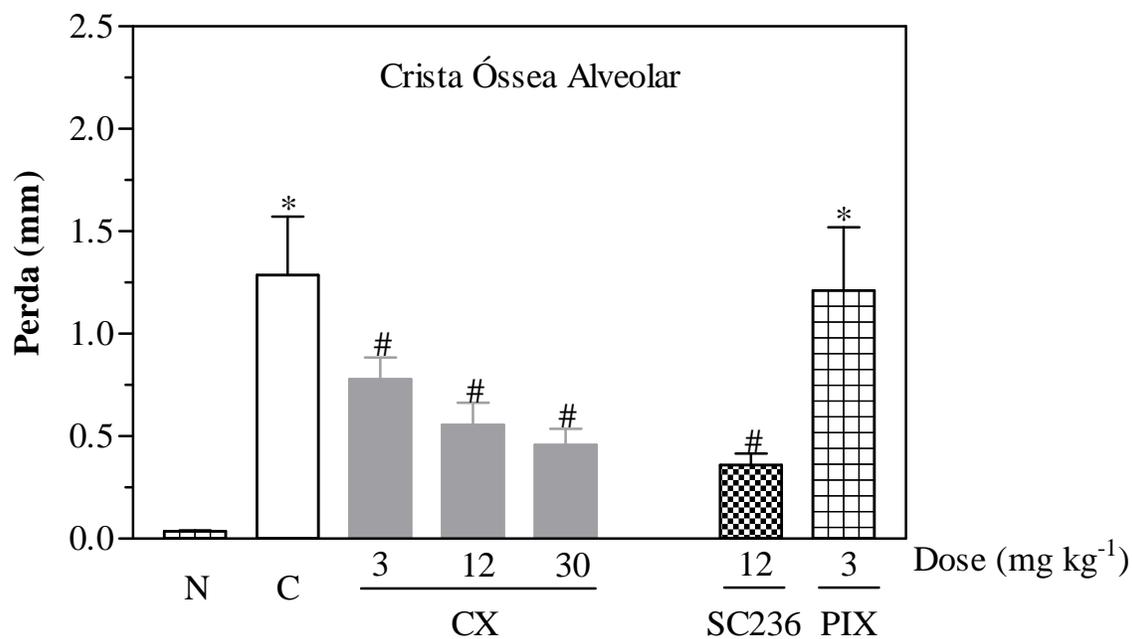
Para excluir a possibilidade de que os excipientes presentes na droga de uso comercial, celecoxibe, não seriam responsáveis pelos efeitos observados, o composto experimental inibidor seletivo de COX-2, SC236, foi administrado em ratos com DP em dose previamente descrita como antiinflamatória ( $12 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Francischi *et al.*, 2002). Os efeitos observados mimetizaram os resultados obtidos com a inibição de COX-2 por celecoxibe (Gráficos 3, 4 e 5).

O inibidor não seletivo de COX, piroxicam, apresenta maior atividade de inibição sobre COX-1 que COX-2. A administração (s.c.) de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  desse composto (dose anti-hiperalgésica, mas não antiedematogênica em um modelo de inflamação aguda em pata de ratos de acordo com Francischi *et al.*, 2002) não diminuiu as perdas de inserção periodontal e da crista óssea alveolar. Observou-se uma tendência de redução na perda de inserção de fibras muito semelhante à causada pela menor dose de celecoxibe. Porém, não houve diferença estatística significativa entre o grupo piroxicam e o grupo controle ( $p>0,05$ ) (Gráficos 3 e 4). A administração de piroxicam do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia inibiu

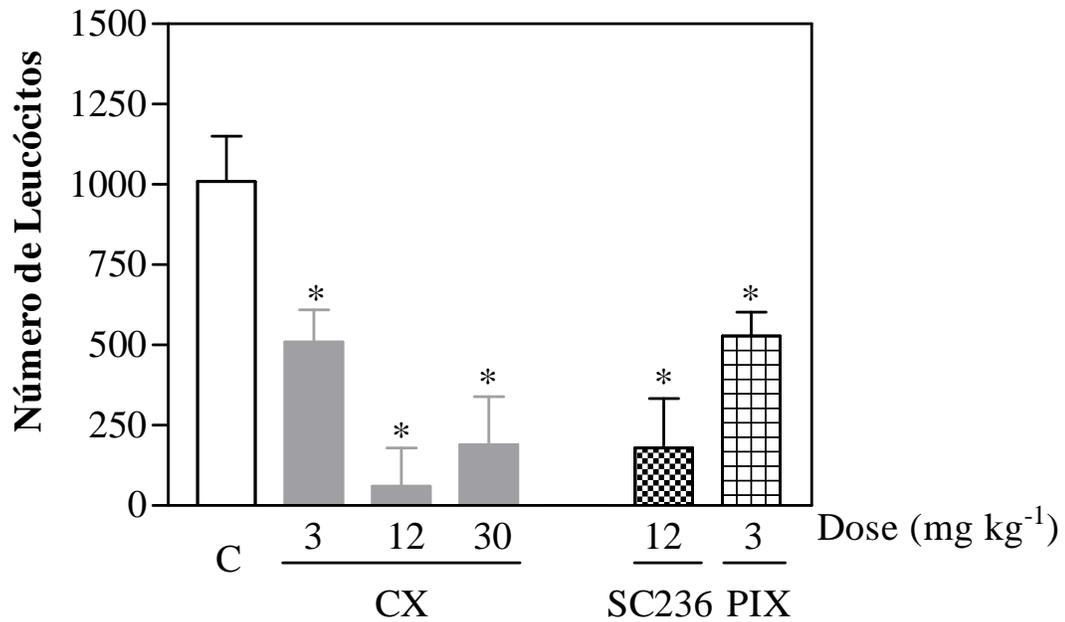
significativamente ( $p < 0,05$ ) o recrutamento celular para a gengiva de ratos com DP (Gráfico 5).



**Gráfico 3: Redução da perda de inserção periodontal após a administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e ao piroxicam (PIX).** Os animais foram tratados (s.c.) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5 animais por grupo, exceto grupo C (n=6).



**Gráfico 4: Redução da perda da crista óssea após a administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e ao piroxicam (PIX).** Os animais foram tratados (s.c.) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto grupo C ( $n=6$ ).



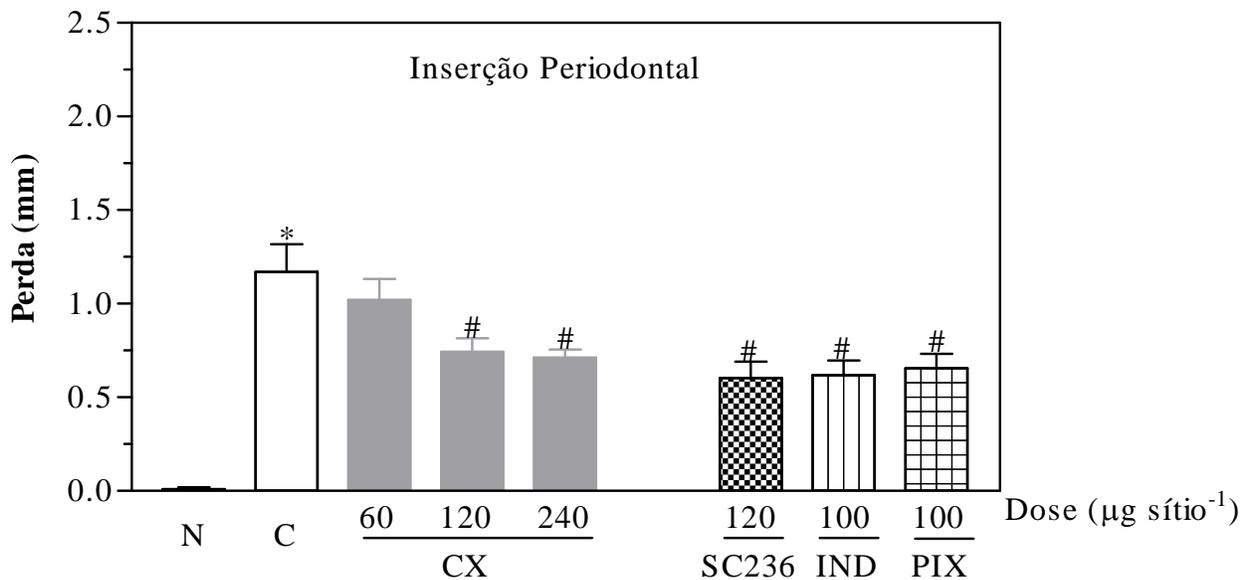
**Gráfico 5: Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparado ao composto experimental SC236 ou ao piroxicam (PIX) no número de leucócitos presentes na gengiva de ratos com periodontite.** Os animais foram tratados no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto grupo C ( $n=6$ ).

*5.3 Efeito da administração local de inibidores seletivos (celecoxibe e SC236) e não seletivos (indometacina e piroxicam) de COX-2 na DP experimental*

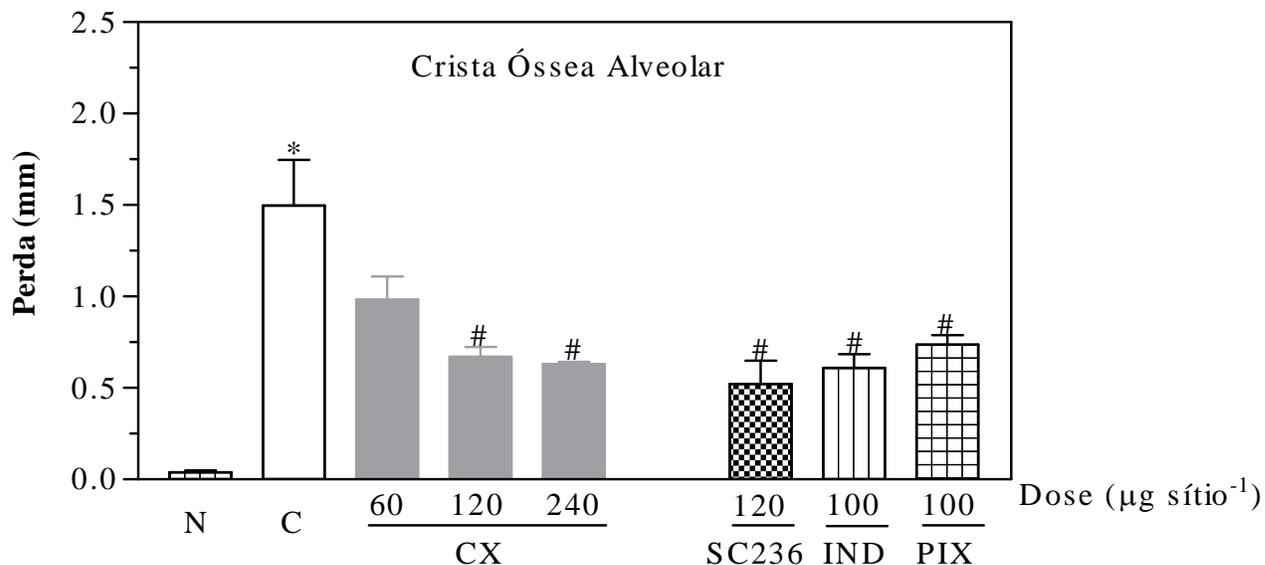
A administração local de celecoxibe ( $60\text{-}240\ \mu\text{g sítio}^{-1}\ \text{dia}^{-1}$ ) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a indução da DP diminuiu as perdas de inserção e óssea, bem como o recrutamento celular para a gengiva dos ratos doentes. Esse inibidor seletivo de COX-2 produziu efeitos dependentes das doses utilizadas e semelhantes aos observados com a sua administração sistêmica (Gráficos 6, 7 e 8).

O efeito máximo foi obtido com a dose de  $120\ \mu\text{g sítio}^{-1}\ \text{dia}^{-1}$  de celecoxibe. A magnitude dessa diminuição alcançou valores de 37% para a perda de inserção, 56% para a perda da crista óssea alveolar e 43% para a redução do número de leucócitos em relação aos animais controle (Gráficos 6, 7 e 8).

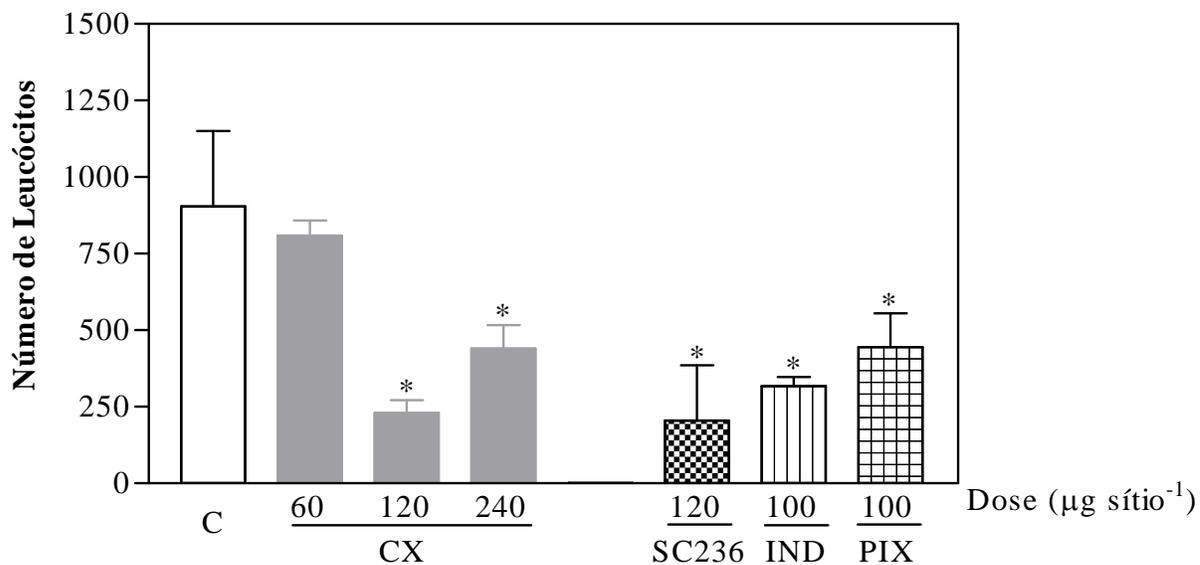
De maneira semelhante, a administração local do composto experimental SC236 ( $120\ \mu\text{g sítio}^{-1}\ \text{dia}^{-1}$ ) e do inibidor não seletivo de COX, indometacina ( $100\ \mu\text{g sítio}^{-1}\ \text{dia}^{-1}$ ), também preveniu o desenvolvimento de todos os sinais avaliados da DP. Assim como o celecoxibe, o efeito local do SC236 e da indometacina foi comparável ao da administração sistêmica. Apenas o piroxicam apresentou um perfil de resposta diferente do observado com sua administração sistêmica, quando não inibiu nem a perda de inserção, nem a perda da crista óssea alveolar. A administração local desse composto ( $100\ \mu\text{g sítio}^{-1}\ \text{dia}^{-1}$ ) inibiu tanto ambas as perdas como a migração celular (Gráficos 6, 7 e 8).



**Gráfico 6: Redução da perda de inserção periodontal após a administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX).** A DP foi induzida por ligadura no dia zero, os animais foram tratados do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5 animais por grupo.



**Gráfico 7: Redução da perda da crista óssea alveolar após a administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparadas ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX).** A DP foi induzida por ligadura no dia zero, os animais foram tratados no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5 animais por grupo.

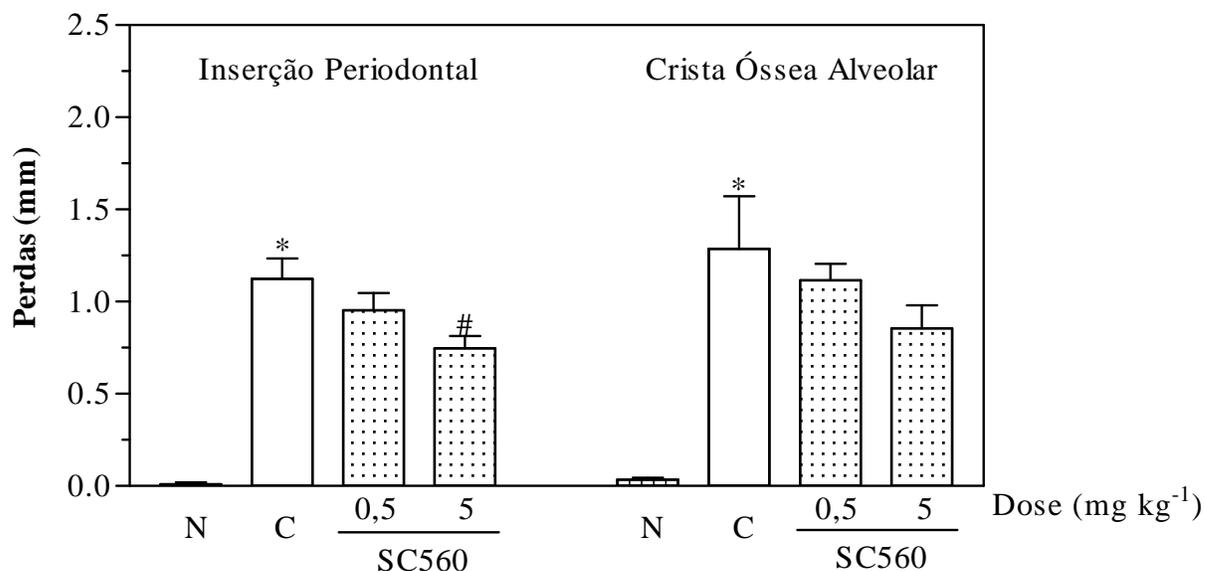


**Gráfico 8: Efeito da administração local de diferentes doses de celecoxibe (CX) comparado ao composto experimental SC236 e aos inibidores não seletivos de COX, indometacina (IND) e piroxicam (PIX), no número de leucócitos presentes na gengiva de ratos com periodontite.** Os animais foram tratados no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM, n=5 animais por grupo.

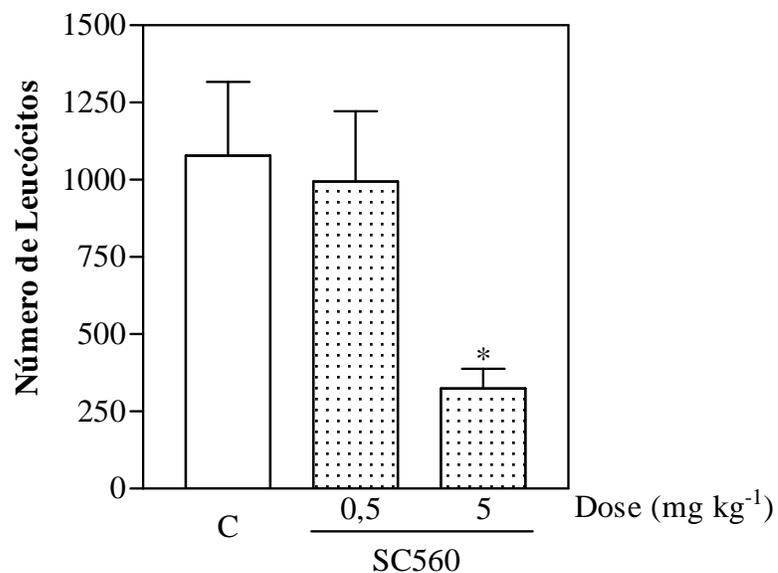
5.4 *Efeito da administração sistêmica e local do inibidor seletivo de COX-1, SC560, na DP experimental em ratos*

A administração sistêmica (s.c.) de 5 mg kg<sup>-1</sup> de SC560, um inibidor seletivo da enzima COX-1, no início do desenvolvimento da DP, diminuiu a perda de inserção periodontal e a migração celular de maneira semelhante ao observado para os inibidores seletivos de COX-2. No entanto, a inibição de COX-1 não reduziu significativamente a perda da crista óssea alveolar ( $p>0,05$ ) (Gráficos 9 e 10).

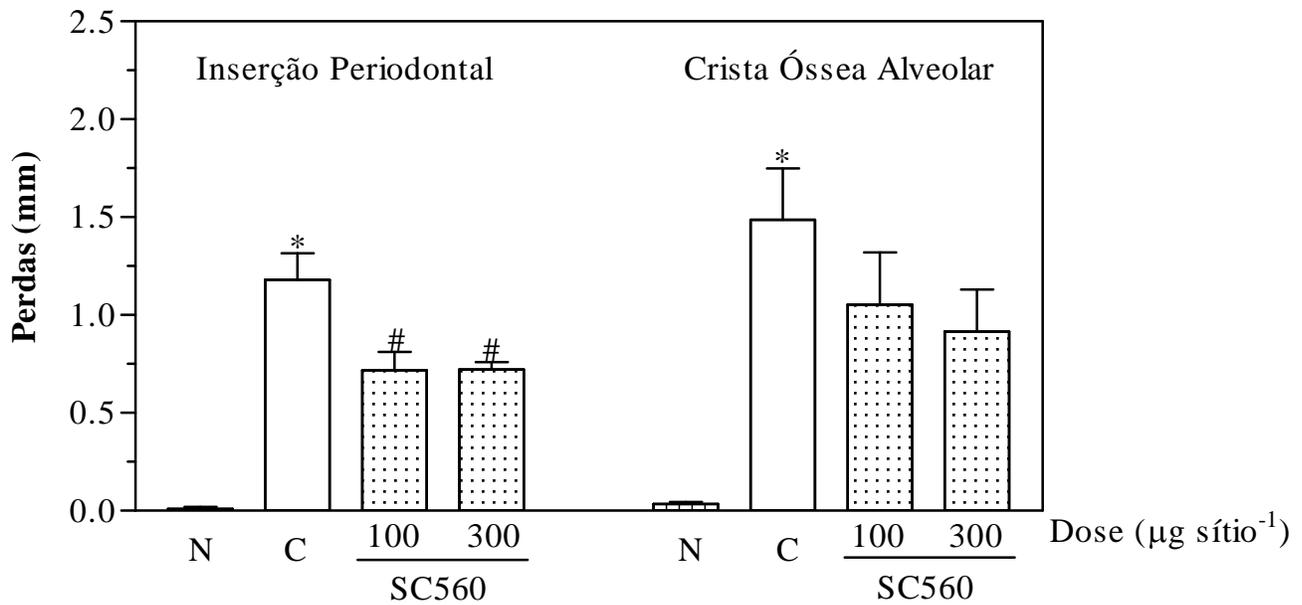
A administração local de SC560 (100 ou 300 µg sítio<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) apresentou efeitos semelhantes aos da administração sistêmica, i.e. reduziu significativamente a perda de inserção e o número de leucócitos na gengiva de ratos com DP, mas não reverteu a perda da crista óssea alveolar (Gráficos 11 e 12).



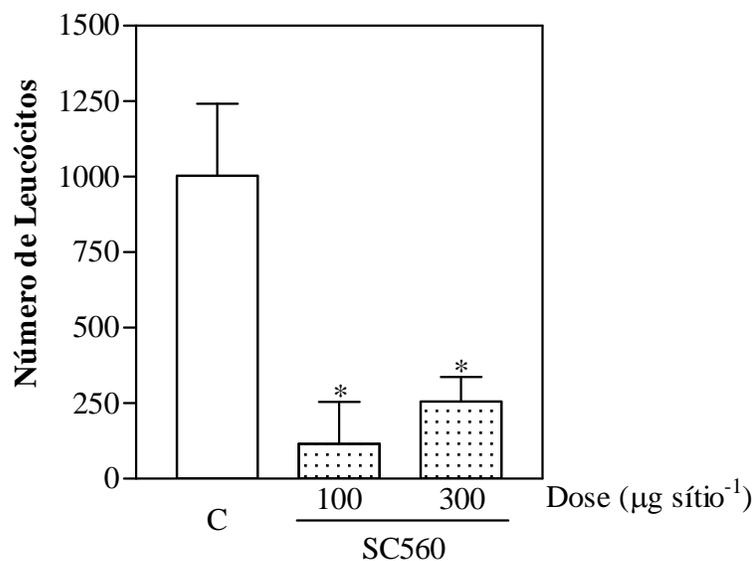
**Gráfico 9: Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, nas perdas de inserção e da crista óssea alveolar em ratos com periodontite.** Os animais foram tratados (s.c.) no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto para o grupo SC560 0,5 mg kg<sup>-1</sup> ( $n=4$ ).



**Gráfico 10: Efeito da administração sistêmica de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, na migração celular para a gengiva de ratos com periodontite.** Os animais foram tratados (s.c) no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto para o grupo SC560 0,5 mg kg<sup>-1</sup> ( $n=4$ ).



**Gráfico 11: Efeito da administração local de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, nas perdas de inserção e da crista óssea alveolar em ratos com periodontite.** Os animais foram tratados no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. N indica animais *naive*, sem DP, e C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* e # indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos N e C, respectivamente, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto para o grupo SC560 100  $\mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  ( $n=4$ ).

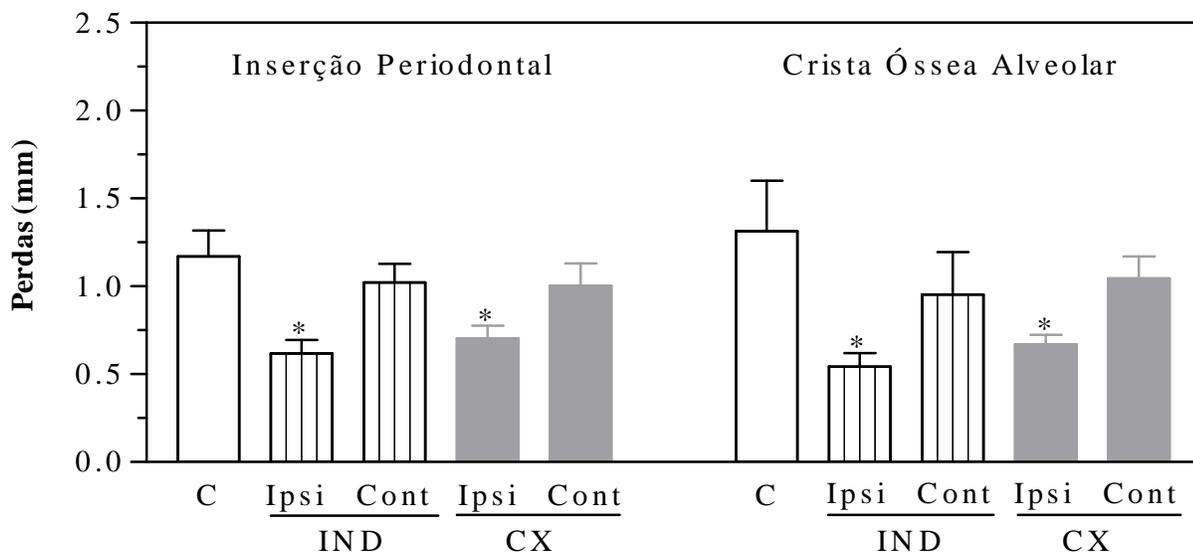


**Gráfico 12: Efeito da administração local de diferentes doses de SC560, um inibidor seletivo de COX-1, na migração celular para a gengiva de ratos com periodontite.** Os animais foram tratados no 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a colocação do fio e sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. C indica grupo controle, com DP e tratado com veículo. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM,  $n=5$  animais por grupo, exceto para o grupo SC560 100  $\mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  ( $n=4$ ).

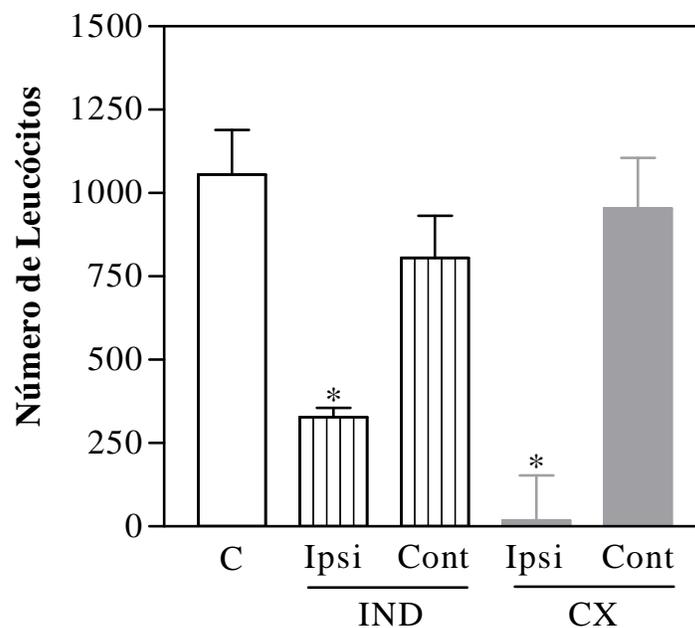
### *5.5 Efeito da administração ipsi e contralateral de indometacina ou celecoxibe na DP experimental em ratos*

Para verificar se as doses usadas na administração local das drogas exerceram efeitos primariamente locais, e não sistêmicos, indometacina ( $100 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ou celecoxibe ( $120 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) foram administrados em dois diferentes grupos de animais: na mucosa adjacente ao segundo molar superior esquerdo que recebeu a ligadura (administração ipsilateral) ou na mucosa adjacente ao dente do lado oposto (administração contralateral). A avaliação da perda dos tecidos periodontais foi realizada no dente que recebeu a ligadura.

Apenas a administração ipsilateral de indometacina ou celecoxibe diminuiu as perdas de inserção periodontal e da crista óssea alveolar quando comparado com a administração das mesmas drogas no lado contralateral (Gráfico 13). De maneira similar, o tratamento contralateral dos animais no início da DP não reduziu o recrutamento leucocitário para o tecido gengival adjacente ao dente com a ligadura (Gráfico 14). Isso confirma o efeito local tanto da indometacina quanto do celecoxibe, pelo menos nas doses em que as drogas foram utilizadas neste experimento.



**Gráfico 13: Comparação entre a administração ipsi e contralateral de indometacina e celecoxibe nos indicadores da DP experimental.** Indometacina (IND-Cont,  $100 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ou celecoxibe (CX-Cont,  $120 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) foi injetado localmente na mucosa adjacente ao dente não ligado (segundo molar direito) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio, ao passo que nenhum tratamento foi realizado no lado ligado. Os animais foram sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. Os animais controle (C) receberam 0,1 ml de salina no lado direito. O grupo ipsilateral recebeu indometacina (IND-Ipsi,  $100 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ou celecoxibe (CX-Ipsi,  $120 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) na mucosa adjacente ao dente com a ligadura (segundo molar superior esquerdo). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por \* em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls ( $n=5$  animais por grupo).



**Gráfico 14: Comparação entre a administração ipsi e contralateral de indometacina e celecoxibe na migração celular para a gengiva de ratos com DP experimental.** Indometacina (IND-Cont,  $100 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ou celecoxibe (CX-Cont,  $120 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) foi injetado localmente na mucosa adjacente ao dente não ligado (segundo molar direito) do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia após a colocação do fio, ao passo que nenhum tratamento foi realizado no lado ligado. Os animais foram sacrificados no 11<sup>o</sup> dia. Os animais controle (C) receberam 0,1 ml de salina no lado direito. O grupo ipsilateral recebeu indometacina (IND-Ipsi,  $100 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) ou celecoxibe (CX-Ipsi,  $120 \mu\text{g sítio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) na mucosa adjacente ao dente com a ligadura (segundo molar superior esquerdo). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por \* em relação ao grupo C, usando teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls ( $n=5$  animais por grupo).

# Discussão

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 *Os antiinflamatórios não esteroidais e a doença periodontal*

Nos dias atuais, a patogênese da doença periodontal (DP) tem sido amplamente relacionada à resposta do hospedeiro aos microrganismos periodontopatogênicos e não à simples presença desses no periodonto. Deste modo, as pesquisas que antes se voltavam para o desenvolvimento de agentes capazes de reduzir o número de bactérias presentes nos sítios com DP e para o tratamento convencional de raspagem e alisamento radicular, hoje buscam a associação desses procedimentos com estratégias que diminuam a resposta inflamatória descontrolada no periodonto (Van Dyke & Serhan, 2003). Quando um processo inflamatório crônico e destrutivo prepondera na etiologia de uma doença, a terapêutica baseada no uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) se torna uma das primeiras opções de tratamento. Neste trabalho, de fato, confirmamos a eficácia de tais compostos em um modelo experimental de DP em ratos.

O presente estudo mostrou que existe um período crítico de intervenção farmacológica por AINEs na DP experimental, o que se mostrou diferente do tratamento da DP com opióides, como observado em trabalho anterior em nosso laboratório (Pacheco *et al.*, 2007). A administração de celecoxibe e rofecoxibe, inibidores seletivos da enzima COX-2, nos estágios iniciais da doença, impediu o desenvolvimento da DP, i.e. reduziu as perdas de inserção e óssea, bem como a migração celular para a gengiva de ratos com DP. Além disso, mostramos que a eficácia desses bloqueadores seletivos de COX-2 foi comparável à indometacina, um AINE tradicional utilizado como droga antiinflamatória padrão (Vane, 1971).

No entanto, quando administrados no período correspondente ao pico da DP (do 9<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dia), os mesmos fármacos não reverteram as perdas óssea e de inserção já estabelecidas, limitando-se em diminuir o número de leucócitos presentes no tecido gengival. De acordo com Pacheco *et al.* (2007), o nono dia da DP já é caracterizado por perdas muito próximas das máximas observadas nesse modelo experimental. Sendo assim, a terapia com antiinflamatórios nesse período não é capaz de paralisar o processo inflamatório a tempo de evitar a lesão tecidual. É possível inferir também que esses fármacos não apresentam potencial de indução de neoformação óssea ou de reinserção de fibras significativo para a reconstituição do tecido lesado, pelo menos neste modelo experimental.

A administração do composto experimental SC236 do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia da indução da DP reproduziu os efeitos da indometacina, do celecoxibe e do rofecoxibe, fármacos utilizados em suas formulações comerciais. Isso reforça o fato de que as respostas observadas decorreram do princípio ativo dessas drogas e não dos respectivos excipientes.

Todos esses achados estão de acordo com relatos de outros autores. Diversos trabalhos atribuem a destruição dos tecidos periodontais observada na DP à ação dos metabólitos do ácido araquidônico, especialmente prostaglandina E<sub>2</sub>. De fato, alguns estudos já demonstraram uma relação entre níveis aumentados de PGE<sub>2</sub> em sítios gengivais e destruição periodontal (Paquette & Williams, 2000; Miyauchi *et al.*, 2004). Desde a identificação de duas isoformas de enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), a inibição de COX-2 tem sido relacionada à redução dos sinais e sintomas da inflamação (Smith *et al.*, 1996), e no caso da DP não parece ser diferente. Inúmeras publicações já mostraram que o bloqueio seletivo de COX-2 pode ser uma boa alternativa para limitar o desenvolvimento da DP. Antiinflamatórios como o celecoxibe

e a indometacina provaram ser eficazes em reduzir a destruição do osso alveolar, a migração celular e o extravasamento de plasma na DP em outros estudos utilizando o mesmo modelo experimental deste trabalho. Tal efeito é atribuído à habilidade dos AINEs em diminuir os níveis de PGs pela inibição de COX-2 (Bezerra *et al.*, 2000; Lohinai *et al.*, 2001; Holzhausen *et al.*, 2002). No entanto, é importante salientar que a DP é uma doença crônica e o uso contínuo e prolongado de AINEs na terapêutica de qualquer doença pode ser até mesmo fatal (FitzGerald & Patrono, 2001; Jüni *et al.*, 2004; Mitchell & Warner, 2006).

### *6.2 Redução de prostaglandinas pelos AINEs versus mecanismos envolvidos na patogênese da doença periodontal*

Apesar da eficácia terapêutica dos AINEs no tratamento da DP, tanto experimental em animais quanto em humanos, é importante entender como a redução dos mediadores inflamatórios derivados das COXs pode influenciar nos sinais dessa doença.

Algumas hipóteses são descritas para explicar os mecanismos por meio dos quais a redução nos níveis de prostaglandinas como a PGE<sub>2</sub> impede a progressão da DP. Sabe-se, por exemplo, que as prostaglandinas podem influenciar a expressão de enzimas como as metaloproteinases de matriz e citocinas como RANKL e osteoprotegerina, componentes importantes na perda de inserção periodontal e na perda óssea observadas na DP (Liu *et al.*, 2003; Sorsa *et al.*, 2004).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação da maioria das proteínas de matriz extracelular durante a organogênese, crescimento e remodelamento tecidual normal. A expressão e atividade das MMPs nos

tecidos adultos é normalmente muito baixa, mas aumentam significativamente em várias condições patológicas que podem levar à destruição tecidual indesejada, como as doenças inflamatórias, crescimento de tumor e metástases (Sorsa *et al.*, 2004). Uma vez que bactérias periodontopatogênicas estão sempre presentes na periodontite, seria lógico inferir que as colagenases na DP se originassem de fontes microbianas. Apesar disso, extratos de tecido gengival, fluido crevicular gengival e outras amostras de tecidos periodontais produzem um padrão de clivagem de colágeno tipo I característico de colagenases de mamíferos, não de bactérias. Em casos de estímulo apropriado, a degradação de colágeno é, em sua maior parte, induzida por MMPs de células do hospedeiro, como fibroblastos gengivais e células inflamatórias (Cox *et al.*, 2006; Sorsa *et al.*, 2004).

Na DP e em outras doenças inflamatórias, os mediadores derivados do ácido araquidônico podem interferir na regulação da liberação e atividade das MMPs. Ruwanpura *et al.* (2004) demonstraram que em fibroblastos gengivais humanos de indivíduos saudáveis a interação de PGE<sub>2</sub> com receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> para PGs diminuiu a produção de MMP-3 induzida por IL-1β. No entanto, em células de tecidos periodontais doentes, o padrão dessa produção de MMP foi completamente alterado, ocorrendo aumento expressivo via receptores EP<sub>1</sub>. O aumento da produção de MMPs induzido por PGE<sub>2</sub> em cementoblastos, células que produzem o cemento – um componente importante do periodonto – também já foi descrito, podendo constituir um mecanismo de destruição do tecido conjuntivo de inserção periodontal em condições inflamatórias (Oka *et al.*, 2007). De maneira semelhante, uma correlação significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub>, MMP-8 no fluido crevicular e profundidade de bolsa periodontal foi encontrada em pacientes fumantes e não-fumantes portadores de DP refratária. Os sítios que apresentaram altos níveis de PGE<sub>2</sub> mostraram níveis

correspondentemente altos de MMP-8 (Söder, 1999). Deste modo, as alterações nos níveis de PGs por inibidores seletivos de COX-2 poderiam modificar a expressão e atividade das MMPs, um dos principais mecanismos de destruição dos tecidos moles periodontais.

De maneira semelhante, a PGE<sub>2</sub> pode influenciar importantes mecanismos de perda óssea. Apesar de as bactérias periodontopatogênicas desencadear a cascata de respostas do hospedeiro, são as citocinas produzidas pelas células inflamatórias as responsáveis por estimular a osteólise na doença periodontal. Os fatores locais envolvidos na atividade de osteoclastos incluem, entre outros, a PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Várias evidências indicam que esses fatores afetam o remodelamento ósseo e têm um papel essencial na regulação tanto fisiológica quanto patológica do osso (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Galbraith *et al.*, 1997). É importante salientar, no entanto, que apesar de as citocinas, por si só, exercerem um papel na ativação dos osteoclastos, nenhuma delas é capaz de induzir a formação dessas células diretamente. Por isso, de suma importância foram os estudos que mostraram que mediadores como IL-11, IL-6 e PGE<sub>2</sub> podem induzir a expressão de um outro mediador conhecido como RANKL (Tsukii *et al.*, 1998).

O RANKL ou o ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B (*Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand*, também conhecido como TRANCE – *TNF-Related Activation-Induced Cytokine* – ou ODF – *Osteoclast differentiation Factor*) é um membro da superfamília de fatores de necrose tumoral expresso por osteoblastos, fibroblastos e células T e B ativadas, que promove a sobrevivência de células dendríticas e que desencadeia a diferenciação e ativação de osteoclastos, ativando a reabsorção óssea (Fuller *et al.*, 1998). O RANKL exerce seus efeitos biológicos pela ligação a seu receptor, o receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANK) em osteoclastos. A atividade biológica do RANKL é

neutralizada pela ligação do falso ligante osteoprotegerina (OPG) que também é um membro da superfamília do receptor TNF. Camundongos deficientes para OPG exibem uma diminuição na densidade óssea total, caracterizada por porosidade óssea trabecular e cortical intensa, adelgaçamento marcante dos ossos do esqueleto e uma alta incidência de fraturas (Simonet *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos já mostram que indivíduos com DP apresentam expressão aumentada de RANKL nos tecidos periodontais ou no fluido crevicular, refletindo um aumento da relação RANKL/OPG quando comparados a pacientes com periodonto saudável (Garlet *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2003) também mostraram aumento de mRNA para RANKL na periodontite em estágio avançado. Em contraste, a expressão de OPG na DP mostrou-se diminuída tanto em seu estágio avançado como moderado.

Nesse contexto, destaca-se que os mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico, além de ativarem diretamente osteoclastos, também influenciam essa via RANKL/OPG. Kojima *et al.* (2006) mostraram, por exemplo, que a produção de RANKL por células de polpa dentária humana é parcialmente dependente da produção de PGE<sub>2</sub>, sendo que um inibidor seletivo de COX-2 (NS-398), ao diminuir os níveis de PGE<sub>2</sub>, reduziu também os níveis de RANKL. Consistente com esses achados são os dados apresentados por Wani *et al.* (1999), que mostraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de estimular a formação de osteoclastos em culturas de células esplênicas via RANKL, apoiando a noção de um efeito direto das prostaglandinas nos precursores hematopoiéticos de osteoclastos. Isso pode explicar os efeitos benéficos da administração de inibidores seletivos de COX-2 na diminuição da progressão da DP, como os observados no presente estudo.

### 6.3 Outros efeitos benéficos da inibição de COX-2 para a resolução da inflamação periodontal

A importância dos inibidores seletivos de COX-2 em impedir a destruição periodontal não está associada apenas à sua habilidade de diminuir a produção de PGE<sub>2</sub>, mas também de controlar a liberação de IL-6 estimulada por IL-1 em fibroblastos de pacientes com periodontite avançada (Tripton *et al.*, 2003). Além disso, a IL-6 demonstrou exercer um papel na modulação da cascata inflamatória na periodontite crônica (Lin *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram um efeito benéfico adicional da nimesulida, um inibidor relativamente seletivo de COX-2, na diminuição dos níveis gengivais de PGF<sub>2α</sub> mais que de PGE<sub>2</sub> (Vardar *et al.*, 2003). Alguns trabalhos na literatura mostraram que a inibição de PGF<sub>2α</sub> por *coxibes* reduz a migração celular para sítios inflamados (Menezes *et al.*, 2005). Por outro lado, a PGF<sub>2α</sub> mostrou aumentar os níveis de IL-6 nos sítios periodontais (Noguchi *et al.*, 2001). Deste modo, os efeitos benéficos da inibição seletiva de COX-2 na doença periodontal não podem ser atribuídos somente aos baixos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub>, mas possivelmente também à inibição de PGF<sub>2α</sub>.

Além disso, ao se inibirem as enzimas COXs e conseqüentemente seus produtos metabólicos com o uso dos AINEs, o ácido araquidônico formado e livre torna-se passível de degradação por outras enzimas. Dentre elas estão as 15-lipooxigenases que convertem tal ácido graxo em lipoxinas (LXs). As LXs parecem exercer papel importante na redução das respostas dos neutrófilos na inflamação (Van Dyke & Serhan, 2003). Em um trabalho realizado por Pouliot *et al.* (2000), as LXs induziram uma diminuição na expressão do mRNA de COX-2. Elas também se mostraram potentes inibidoras da migração de polimorfonucleares neutrófilos para o sítio da infecção periodontal. Sabe-se que o elevado número de neutrófilos nos sítios com DP,

como observado na gengiva de animais controle neste trabalho, e o excesso de atividade e liberação de espécies reativas de oxigênio por essas células são grandes responsáveis pela destruição tecidual na inflamação periodontal (Van Dyke & Serhan, 2003). Os neutrófilos podem promover lise direta de células gengivais, bem como apresentar atividade deletéria indiretamente por meio da geração de superóxido, peróxido de hidrogênio, mieloperoxidase e outros radicais livres de oxigênio (Chapple, 1997).

Sendo assim, os AINEs, além de inibirem a migração de leucócitos via redução de mediadores derivados de COX (Menezes *et al.*, 2005), podem deslocar a cascata de metabolismo do ácido araquidônico em favor da formação de mediadores que também inibem esse processo. A geração de LXs é atualmente tida como um dos passos fundamentais para a resolução da inflamação (Van Dyke & Serhan, 2003).

#### *6.4 O envolvimento de COX-1 na doença periodontal experimental em ratos*

A COX-1 é considerada uma isoenzima constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, que regula funções fisiológicas como a citoproteção gástrica por meio da síntese de prostaciclina e tromboxanas (FitzGerald & Patrono, 2001; Vane *et al.*, 1998; Mitchell & Warner, 2006). Apesar disso, a participação de COX-1 em processos inflamatórios também já foi descrita em alguns modelos animais de inflamação (Smith, *et al.*, 1998; Siqueira-Junior *et al.*, 2003).

Em nossos experimentos, o inibidor seletivo de COX-1, SC560, reduziu os sinais da DP observados no presente estudo, especificamente a perda de inserção periodontal e a migração celular para o sítio afetado. Tais efeitos foram similares aos mostrados pelos inibidores seletivos de COX-2. Apesar disso, essa droga não afetou a perda óssea

alveolar, sugerindo um perfil de atividade diferente para as isoformas COX-1 e COX-2 na DP experimental.

A administração sistêmica do piroxicam, um AINE tradicional que apresenta duzentas e cinquenta vezes mais seletividade para COX-1 que para COX-2, apresentou efeitos muito semelhantes ao do SC560 no presente trabalho. Houve uma redução significativa do recrutamento leucocitário e uma tendência de diminuição da perda de inserção, mas que não foi estatisticamente significativa. Isso pode ser compreendido pelo maior efeito dessa droga sobre COX-1 ou pela dose administrada. Em doses maiores que a utilizada neste estudo, o piroxicam apresentou atividade anti-hiperalgésica e antiedematogênica em um modelo experimental de inflamação aguda (Francischi *et al.*, 2002). O aumento da dose pode ampliar o espectro de ação dessa droga sobre COX-2, o que poderia ser suficiente para se detectarem respostas significativas em relação às perdas da DP experimental. No entanto, maiores doses não foram utilizadas neste trabalho.

Esses resultados fornecem claras evidências para um envolvimento de COX-1 no desenvolvimento da DP. Consistente com tais achados está um recente estudo que mostrou que mais de 30% da PGE<sub>2</sub> gerada em tecidos sinoviais de pacientes com osteoartrite ocorreu via COX-1 (Knorth *et al.*, 2004). No entanto, também recentemente foi mostrado que o composto experimental SC560 inibiu a síntese de PGE<sub>2</sub> por uma via independente de COX-1 em experimentos *in vitro*, o que colocaria em dúvida sua atividade sobre essa enzima nos modelos *in vivo* (Brenneis *et al.*, 2006).

Nossos dados também mostraram um efeito positivo do inibidor seletivo de COX-1 no modelo de DP experimental em ratos quando administrado localmente na mucosa bucal. A administração local de SC560 reproduziu os efeitos da administração

sistêmica, i.e. reduziu a perda de inserção periodontal e a migração celular para o sítio afetado.

Entretanto, a administração local do piroxicam apresentou um perfil de resposta diferente da administração sistêmica: reduziu as perdas de inserção e óssea, bem como a migração celular. É provável que a dose de  $100 \mu\text{g sítio}^{-1}$  seja elevada o suficiente para atuar eficazmente sobre COX-1 e -2 localizadas na gengiva. Enquanto para os outros AINEs utilizados neste trabalho a relação de doses sistêmica/local foi, em geral, de trinta vezes, para o piroxicam essa redução de dose foi de nove vezes, o que poderia explicar a diferença nos perfis entre as respostas sistêmica e local.

Mesmo assim, nossos achados estabelecem claramente um perfil diferente de atividade para COX-1 e COX-2 nesse modelo experimental de doença periodontal.

### *6.5 Perspectivas para o uso local de fármacos na terapêutica da DP*

Apesar de inúmeras evidências sugerirem o uso de antiinflamatórios na terapêutica de doenças como a artrite reumatóide e mesmo a doença periodontal, sabe-se que um dos maiores entraves na terapia crônica com AINEs tradicionais é a toxicidade gastrointestinal. A irritação gástrica direta induzida por esses fármacos e as úlceras e sangramentos causados pela inibição da COX-1 constitutiva são tão desconfortáveis ao paciente quanto a dor do processo inflamatório que o levou a usar a droga (Whittle, 2003). Quando os *coxibes* surgiram na década de 90, muitos pensaram estar solucionados os problemas induzidos pelos AINEs não seletivos. No entanto, o risco aumentado de doenças cardiovasculares como trombose vascular e infarto do miocárdio pela alteração no balanço  $\text{PGI}_2 / \text{TXA}_2$  desfez a idéia do AINE perfeito (FitzGerald & Patrono, 2001; Jüni *et al.*, 2004; Mitchell & Warner, 2006). Deste modo,

o uso de AINEs em doenças crônicas ainda constitui um problema e o uso desses fármacos na rotina terapêutica da DP é pouco provável.

Por isso, nossos dados que mostram o efeito local dos AINEs na DP experimental são de grande relevância. Tanto os *coxibes* quanto os AINEs tradicionais inibiram significativamente as perdas óssea e de inserção, bem como o recrutamento de leucócitos, quando administrados na mucosa adjacente ao dente com DP do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia. Essa redução atingiu magnitudes muito semelhantes às relativas à administração sistêmica dos mesmos fármacos, mesmo com uma notável redução de dose.

O fato de a administração contralateral de celecoxibe ou de indometacina não interferir significativamente nos sinais da DP garante que as doses utilizadas foram pequenas o suficiente para exercerem efeitos primariamente locais. Isso pode constituir uma vantagem adicional no tratamento da DP, uma vez que a redução da dose diminuiria os efeitos adversos sistêmicos amplamente associados aos *coxibes* e aos AINEs tradicionais (FitzGerald & Patrono, 2001; Whittle, 2003; Jüni *et al.*, 2004; Mitchell & Warner, 2006).

O uso tópico de antiinflamatórios na terapia da DP já tem sido explorado na literatura. Li *et al.* (1996) propuseram a utilização de cremes contendo cetoprofeno 1%, um AINE, no tratamento da DP induzida por ligadura em macacos *rhesus*. Os animais foram tratados diariamente com o creme durante seis meses. Tais cremes reduziram eficazmente os sinais da DP avaliados, especialmente a perda óssea, se comparado com o grupo controle. Apesar disso, o curto período de permanência de uma formulação como essa no sítio de aplicação pode constituir um entrave para sua utilização.

Além de se observarem as características organolépticas do produto, é necessário lembrar que a cavidade oral é a todo instante banhada pelo fluido salivar, tem a influência de potentes músculos como a língua, assim como constitui a porta de entrada

de alimentos no trato gastrointestinal. Tudo isso influencia na construção de qualquer formulação para a liberação de fármacos na cavidade oral. Tendo em vista esses fatores, Perioli *et al.* (2004) desenvolveram dispositivos mucoadesivos para a administração local de ibuprofeno. A nova formulação foi desenhada particularmente para terapias antiinflamatórias e analgésicas da cavidade bucal. De acordo com os autores do trabalho, tais dispositivos foram estudados *in vitro* e *in vivo* e apresentaram como principal vantagem uma baixa dose de ibuprofeno, apenas suficiente para exercer efeitos terapêuticos locais. A liberação total do fármaco ocorreu dentro de cento e cinquenta minutos, sendo observadas concentrações salivares entre 70 e 210  $\mu\text{g sítio}^{-1}$ . No entanto, parâmetros descritos como satisfatórios pelos autores do trabalho devem ser amplamente avaliados para um dispositivo mucoadesivo como o proposto, por exemplo irritação da mucosa, tolerabilidade e conforto durante a permanência do aparato, elasticidade, flexibilidade, volume e modo de liberação do fármaco pelo dispositivo.

Sendo assim, novas perspectivas são colocadas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a DP. A administração local de fármacos como os AINEs, além de reduzir os efeitos adversos associados a tais drogas pela diminuição da dose, pode constituir uma terapia coadjuvante à tradicional no tratamento dos sinais da DP.

# Conclusões

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente trabalho mostrou que:

\* O período crítico para a intervenção farmacológica com antiinflamatórios não esteroidais na doença periodontal experimental em ratos corresponde ao período inicial da doença, uma vez que a administração dessas drogas quando a DP já se estabeleceu não reverte o quadro de perdas óssea e de inserção observado.

\* As isoformas COX-1 e COX-2 estão envolvidas no desenvolvimento da doença periodontal em ratos, apesar de que o papel da isoforma COX-2 é predominante nos sinais da DP, o que está de acordo com dados já existentes na literatura.

\* A administração local de inibidores seletivos de COX-1 ou COX-2 atinge um perfil de atividade similar ao da administração sistêmica, uma característica importante quando se levam em consideração os efeitos adversos atribuídos às drogas antiinflamatórias não esteroidais. Portanto, a partir dos dados obtidos no presente trabalho, sugere-se o desenvolvimento de novas formulações contendo inibidores seletivos de COX-2 para liberação local visando à redução dos sinais e sintomas da doença periodontal e minimizando os problemas associados à administração sistêmica desses compostos.

# Abstract

## 8 ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is an inflammatory condition of tooth supporting tissues, derived from sub-gingival accumulation of Gram-negative anaerobic bacteria. It is characterized by the progressive destruction of periodontal tissues, which include periodontal ligament and alveolar bone. Host response to the pathogenic microorganisms is one of the main causes of PD development and progression. Inflammatory mediators such as arachidonic acid metabolites have been implicated in PD development, especially those derived from the cyclooxygenase pathway. The purpose of the present study was to investigate the role of systemic and local administration of cyclo-oxygenases (COX-1 and COX-2) inhibitors in a model of PD in rats. A ligature was placed around the second molar of rats. Drugs were administered both from the 3<sup>rd</sup> to the 5<sup>th</sup> or from the 9<sup>th</sup> to the 11<sup>th</sup> day of PD induction and animals were killed by the 11<sup>th</sup> day. Losses of fiber attachment and of alveolar bone were measured morphometrically in histologically prepared sections. Infiltration of cells into gingival tissue surrounding the ligated tooth was also determined. Our results showed that there is a critical period for pharmacological intervention using anti-inflammatory drugs in experimental PD. Systemic and local administration of non-selective (indomethacin, piroxicam) and selective COX-2 (celecoxib, rofecoxib, SC236) inhibitors, from the 3<sup>rd</sup> to the 5<sup>th</sup> day, resulted in significant reduction of the losses of fiber attachment and alveolar bone as well as decreased leukocyte number in gingival tissue. Nevertheless the same drugs were not able to reduce the signs of PD when they were administered from the 9<sup>th</sup> to the 11<sup>th</sup> day after PD induction. Preventive selective inhibition of COX-1, using the experimental compound SC560, was as effective as COX-2 inhibition in reducing local fiber attachment loss and cell migration, but it did not prevent alveolar bone loss. Our results provide evidence for a differential participation of COX-1 and COX-2 in early stages of PD in rats. Furthermore, local administration of selective COX inhibitors reduced the signs of PD to the same extent as systemic treatment. Therapeutic approaches incorporating locally delivered anti-inflammatory drugs could be of benefit for patients suffering from PD.

# Referências Bibliográficas

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANDAR, J.M. (2005). Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* **49**: 517-532.
2. BARAF, H.S. (2007). Efficacy of the newest COX-2 selective inhibitors in rheumatic disease. *Curr Pharm Des* **13**: 2228-2236.
3. BEZERRA, M.M.; LIMA, V.; ALENCAR, V.B.M.; VIEIRA, I.B.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **71**: 1009-1014.
4. BIRKEDAL-HANSEN, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res* **28**: 500-510.
5. BREIVIK, T.; THRANE, P.S.; GJERMO, P.; OPSTAD, P.K.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. (2001). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodont Res* **36**: 295-300.
6. BRENNEIS, C.; MAIER, T.J.; SCHMIDT, R.; HOFACKER, A.; ZULAUF, L.; JAKOBSSON, P.J.; SCHOLICH, K.; GEISSLINGER, G. (2006). Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by SC560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *FASEB J* **20**: 1352-1360.
7. BURT, B.A. (1994). Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *J Am Dent Ass* **125**: 273-279.
8. CHAN, C.C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; FORREST, M.J.; GAUTHIER, J.Y.; GORDON, R.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; KENNEDY, B.; LEBLANC, Y.; LEGER, S.; MANCINI, J.; O'NEILL, G.P.;

- OUELLET, M.; PATRICK, D.; PERCIVAL, M.D.; PERRIER, H.; PRASIT, P.; RODGER, I.; TAGARI, P.; THERIEN, M.; VICKERS, P.; VISCO, D.; WANG, Z.; WEBB, J.; WONG, E.; XU, L.J. YOUNG, R.N.; ZAOMBONI, R.; RIENDEAU, D. (1999). Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 551-560.
9. CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(21): 13926-13931.
10. CHAPPLE, I.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* **24**: 287-296.
11. COX, S.W.; ELEY, B.M.; KIILI, M.; ASIKAINEN, A.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T. (2006). Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Diseases* **12**: 34-40.
12. DENNISON, D.K.; GOTTSEGEN, R.; ROSE, L.F. (1996). Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* **67**: 166-176.
13. ELATTAR, T.M.A.; LIN, H.S.; TIRA, D.E. (1984). Arachidonic acid metabolism in inflamed gingiva and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *J Periodontol* **55**: 536-539.
14. FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. (2001). Drug therapy: the coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* **345**: 433-442.
15. FRANCISCHI, J.N.; CHAVES, C.T.; MOURA, A.C.L.; LIMA, A.S.; FERREIRA-ALVES, D.L.; ROCHA, O.A.; BAKHLE, Y.S. (2002). Selective inhibitors of

- cyclooxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol* **137**: 837-844.
16. FULLER, K.; WONG, B.; FOX, S.; CHOI, Y.; CHAMBERS, T.J. (1998). TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* **188**: 997-1001.
17. GALBRAITH, G.M.; HAGAN, C.; STEED, R.B.; SANDERS, J.J.; JAVED, T. (1997). Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *J Periodontol* **68**: 832-838
18. GARANT, R.R.; CHO, M.I. (1979). Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats: histometric and histologic study. *J Periodont Res* **14**: 297-309.
19. GARLET, G.P.; MARTINS, W.Jr.; FONSECA, B.A.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* **31**: 671- 679.
20. GENCO, A.C.; VAN DYKE, T.; AMAR, S. (1998a). Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol* **6**: 444-449.
21. GENCO, R.J.; HO, A.W.; KOPMAN, J.; GROSSI, S.G.; DUNFORD, R. G.; TEDESCO, L.A. (1998b). Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol* **3**: 288-302.
22. GONZALES, Y.M.; DE NARDIN, A.; GROSSI, S.; MACHTEI, E.E.; GENCO, R.J.; DE NARDIN, E. (1996). Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res* **75**: 796-802.

23. HAN, C.; LENG, J.; DEMETRIS, A.J.; WU, T. (2004). Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21 and p27 and cell cycle arrest. *Cancer Res* **64**: 1369-1376.
24. HOLZHAUSEN, M.; ROSSA JUNIOR, C.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; NASSAR, P.Q.; SPOLIDORIO, D.M.; SPOLIDORIO, L.C. (2002). Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* **73** (9): 1030-6.
25. HUGOSON, A.; JORDAN, T. (1982). Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease. *Commun Dent Oral Epidemiol* **10**: 187-192.
26. JÜNI, P.; NARTEY, L.; REICHENBACH, S.; STERCHI, R.; DIEPPE, P.A.; EGGER, M. (2004). Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* **364**: 2021-2029.
27. KIS, B.; SNIPES, J.A.; BUSIJA, D.W. (2005). Acetaminophen and cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 1-7.
28. KNORTH, H.; DORFMULLER, P.; LEBERT, R.; SCHMIDT, W.E.; WITTENBERG, R.H.; HEUKAMP, M.; WIESE, M.; WILLBURGER, R.E. (2004). Participation of cyclooxygenase-1 in prostaglandin E<sub>2</sub> release from synovitis tissue in primary osteoarthritis *in vitro*. *Osteoarth Cartil* **12**: 658-666.
29. KOJIMA, T.; YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. (2006). Substance P stimulates release of RANKL via COX-2 expression in human dental pulp cells. *Inflam Res* **55**: 78-84.

30. LEE, W.; AITKEN, S.; SODEK, J.; McCULLOCH, C. (1995). Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodont Res* **30**: 23-33.
31. LI, K.L.; VOGEL, R.; JEFFCOAT, M.K.; ALFANO, M.C.; SMITH, M.A.; COLLINS, J.G.; OFFENBACHER, S. (1996). The effect of ketoprofen creams on periodontal disease in rhesus monkeys. *J Periodont Res* **31**: 525-532.
32. LIN, S.J.; CHEN, Y.L.; KUO, M.Y.; LI, C.L.; LU, H.K. (2005). Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine* **30**: 160-167.
33. LIU, D.; XU, J.K.; FIGLIOMENI, L.; HUANG, L.; PAVLOS, N.J.; ROGERS, M.; TAN, A.; PRICE, P.; ZHENG, M.H. (2003). Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* **11**: 17-21.
34. LOHINAI, Z.; BENEDEK, P.; ROSIVALL, L.; FEHÉR, E.; GYÖRFI, A.; FAZEKAS, A.; SALZMAN, A.L.; SZABÓ, C. (1998). Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* **123**: 353-360.
35. LOHINAI, Z.; STACHLEWITZ, R.; SZÉKELY, A.D.; FEHÉR, E.; DÉZSI, L.; SZABÓ, C. (2001). Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life Sciences* **70**: 279-290.
36. MADIANOS, P.N.; BOBETSIS, G.A.; KINANE, D.F. (2002). Is periodontitis associated with an increased risk of coronary heart disease and preterm and/or low birth weight births? *J Clin Periodontol* **29**: S3 22-36.

37. MALTOS, K.L.M.; MENEZES, G.B.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; SANTOS, J.M.; ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. (2004). Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol* **49**:443-450.
38. MENEZES, G.B.; REIS, W.G.P.; SANTOS, J.M.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. (2005). Inhibition of prostaglandin F<sub>2α</sub> by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation* **29**: 163-169.
39. MICHALOWICZ, R. (1994). Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* **65**: 479-488.
40. MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. (2006). COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 75-86.
41. MIYAUCHI, M.; HIRAOKA, M.; OKA, H.; SATO, S.; KUDO, Y.; OGAWA, I.; NOGUCHI, K.; ISHIKAWA, I.; TAKATA, T. (2004). Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Arch Oral Biol* **49**: 739-746.
42. MOCHIZUKI, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. (1999). Enhancement of LPS-stimulated plasminogen activator production in aged gingival fibroblasts. *J Periodont Res* **34**: 251-260.
43. MONTEIRO DA SILVA, A. M.; OAKLY, D. A.; NEWMAN, H. N.; NOHL, R. S.; LLOYD, H. M. (1996). Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **23**: 789-794.
44. MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 66-77.

45. NOGUCHI, K.; ENDO, H.; KONDO, H.; ISHIKAWA, I. (2001). Prostaglandin F<sub>2</sub>α upregulates interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* **36**: 80-87.
46. NONNENMACHER, C.; MUTTERS, R.; FLORES DE JACOBY, L. (2001). Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Cin Microbiol Infect* **7**: 213-217.
47. OFFENBACHER, S.; ODLE, B.M.; VAN DYKE, T.E. (1986). The use of crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* **21**: 101-112.
48. OKA, H.; MIYAUCHI, M.; SAKAMOTO, K.; KITAGAWA, M.; NOGUCHI, K.; SOMERMAN, M.J.; TAKATA, T. (2008). Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits mineralization and enhances matrix metalloproteinase-13 in mature cementoblasts mainly via the EP4 pathway. *Arch Oral Biol* **53**: 243-249.
49. PACHECO, C.F.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; MALTOS, K.L. M.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; FRANCISCHI, J.N. (2007). Local opioids in a model of periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol* **52**(7): 677-683.
50. PAGE, R.C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal diseases: an assessment. *J Periodont Res* **26**: 230-242.
51. PAGE, R.C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H.E.; SEYMOUR, G.J.; KORNMAN, K.S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* **14**: 216-248.
52. PAQUETTE, D.W. (2004). The periodontal-cardiovascular link. *Compend Contin Educ Dent* **25**: 681-692.

53. PAQUETTE, D.W.; WILLIAMS, R.C. (2000). Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol 2000* **24**: 239-252.
54. PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; ANGELICI, F.; RICCI, M.; GIOVAGNOLI, S.; CAPUCCELLA, M.; ROSSI, C. (2004). Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. *J Control Rel* **99**: 73-82.
55. POULIOT, M.; CLISH, C. B.; PETASIS, N. A.; VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. (2000). Lipoxin A<sub>4</sub> analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochem* **39**: 4761-4768.
56. RUWANPURA, S.M.P.M.; NOGUCHI, K.; ISHIKAWA, I. (2004). Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* **83**: 260-265.
57. SALVI, G.E.; LANG, N.P. (2005). The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (selective and non-selective) on the treatment of periodontal diseases. *Curr Pharm Des* **11**: 1757-1769.
58. SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; KELLEY, M.; CHANG, M.S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H.Q.; WOODEN, S.; BENNET, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H.L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T.M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309-319.

59. SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; PETERS, R.R.; BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. (2003). Effects of valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor, on models of acute inflammation in mice. *Pharmacol Res* **48**: 437-443.
60. SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**: 33157-33160.
61. SMITH, C.J.; ZANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. (1998). Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13313-13318.
62. SÖDER, B. (1999). Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E<sub>2</sub> and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis site in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand* **57**: 77-82.
63. SORSA, T.; TJADERHANE, L.; SALO, T. (2004). Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* **10**: 311-318.
64. SUZUMURA, Y.; KAMEYAMA, Y.; MIZUTANI, M.; KATO, M.; KONDO, K.; MABUCHI, R. (1989). Long junctional epithelium produced by application of bacterial protease in rats. *J Periodont Res* **24**: 217-221.
65. TEN CATE, A. R.; TEN CATE, R.; COPELAND, E. (1998). Oral histology: development, structure and function. 5 ed. Mosby-Year Book, Toronto. 497p.
66. TRIPTON, D.A.; FLYNN, J.C.; STEIN, S.H.; DABBOUS, M.K.H. (2003). Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1beta-stimulated prostaglandin E<sub>2</sub> and IL-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* **74**: 1754-1763.
67. TSUKII, K.; SHIMA, N.; MOCHIZUKI, S.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; YANO, K.; SHIBATA, O.; UDAGAWA, N.; YASUDA, H.; SUDA, T.;

- HIGASHIO, K. (1998). Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun* **246**: 337-341
68. VAN DER VELDEN, U. (1984). Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol* **11**: 281-294.
69. VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* **82**: 82-90.
70. VANE, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drugs. *Nat New Biol* **231**: 232-235.
71. VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **18**: 7908-7916.
72. VARDAR, S.; BAYLAS, H.; HUSEYINOV, A. (2003). Effects of selective cyclooxygenase-2 on gingival tissue levels of prostaglandin E<sub>2</sub> and prostaglandin F<sub>2alpha</sub> and clinical parameters of chronic periodontitis. *J Periodontol* **74**: 57-63.
73. WANI, M.R.; FULLER, K.; KIM, N.S.; CHOI, Y.; CHAMBERS, T. (1999). Prostaglandin E<sub>2</sub> cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell spreading and fusion. *Endocrinol* **140**: 1927-1935.
74. WHITTLE, B.J.R. (2003). Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fund Clin Pharmacol* **17**: 301-313.
75. WIEBE, C.B.; PUTNINS, E.E. (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology – an update. *J Can Dent Assoc* **66**: 594-597.

“QUERO CONHECER OS PENSAMENTOS DE DEUS,  
O RESTO É DETALHE.”

ALBERT EINSTEIN, 1879-1955.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)