

Natalia Manrique Cursino

***Avaliação do Efeito do Atenolol
no Processo de Reparo Alveolar
Em Ratos Espontaneamente
Hipertensos (SHR)***

ARAÇATUBA -SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Natalia Manrique Cursino

***Avaliação do Efeito do Atenolol
no Processo de Reparo Alveolar
Em Ratos Espontaneamente
Hipertensos (SHR)***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, para a
obtenção do Título de MESTRE EM
ODONTOPEDIATRIA.

Orientadora: Prof. Dra. Cristina Antoniali Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA -SP

2010

Catálogo na Publicação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

C977a	Cursino, Natalia Manrique Avaliação do efeito do atenolol no processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Natalia Manrique Cursino. -- Araçatuba: [s.n.], 2010. 127 f.; il, tab. + CD ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010. Orientador: Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto 1. Atenolol. 2. Hipertensão. 3. Imunoistoquímica. 4. Densidade óssea. 5. Processo alveolar. 6. Ratos endogâmicos SHR. I.T. Black D27 CDD 617.6
-------	--

Dados Curriculares

Natalia Manrique Cursino

Nascimento: 14/02/1983

Filiação: Jayme Décio Cursino
 Elza Manrique

2004-2007: Curso de Graduação em Odontologia
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp

2008-2010: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
 Odontopediatria
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp

Dedicatória

À Deus:

*“O Eterno que tudo criou sem exceção;
Só o Senhor será considerado justo.
Ele é o rei invencível que permanece para sempre.
Quem será capaz de relatar suas obras?
Quem poderá compreender suas maravilhas?
Quem empreenderá a explicação de sua misericórdia?
Nada há a subtrair, nada a acrescentar às maravilhas de Deus;
Elas são incompreensíveis.
Quando o homem tiver acabado, então estará no começo;
E quando cessar a pesquisa, ficará perplexo.”*

Eclesiástico: I8, I-6

Deus, muito obrigada,
Pelas tristezas e alegrias,
Pelas dificuldades e conquistas,
Pelas pessoas maravilhosas que me acompanham.
Obrigada por sempre nos mostrar o caminho da evolução!!!

*À minha mãe **Elza**,*

*Um exemplo de ser humano, a dedicação em pessoa,
Obrigada é pouco demais para expressar minha gratidão,
Tenho certeza que minhas atitudes valem mais do que qualquer
palavra!*

*Estamos juntas em mais uma conquista, que não seria possível
sem o seu esforço, apoio e dedicação!*

*Cada ligação, cada recepção carinhosa, cada conselho, cada
exemplo, tudo isso sempre me deu forças para seguir meu
caminho...*

*Cada oração, mesmo sem que eu soubesse, valeu à pena!
Obrigada pelo amor incondicional e por nunca me deixar esmaecer,
sempre me incentivando a ir à busca dos meus sonhos!
Amo-te muito!*

Ao meu pai *Jayme* e à *Cida*

Muito obrigada pai, por ser sempre tão carinhoso, pelos conselhos e desabafos! Seu sorriso atinge meu coração de imediato, a sua demonstração de orgulho do seu “Tesourinho” preenche minha vida de alegria! E como já disse, você é o melhor pai do mundo. Nessa minha caminhada sempre me incentivou, e enfatizou a importância do trabalho e da saúde em nossa vida!

Amo-te muito!

Cida, você não é uma madrasta, mas uma “boadrasta” que surgiu em nosso caminho para acrescentar coisas boas! Muito obrigada pelo carinho comigo e pelo cuidado e dedicação com meu pai e com o Luquinhas! Muitas foram nossas conversas, trocas de experiência, onde aprendi muito! Sempre demonstrando sabedoria e fé, sua energia alegrou nossas vidas! Amo você!

AOS meus irmãos *Leandro e Lucas*

E minha cunhada *Luciana*

Lê, você sempre foi companheiro e esteve pronto para ajudar, mesmo distante estamos sempre presentes um na vida do outro! Foi surpreendente seu caminho de evolução, a cada vitória sua, cada conquista de emprego, me senti muito feliz. Da mesma forma que tenho certeza da sua alegria pelas minhas conquistas! Cada conversa, cada ligação, e porque não cada churrasquinho, foram muito importantes nessa caminhada! Obrigada pela amizade e carinho!

A Luty entrou não apenas em sua vida, mas em nossas vidas para trazer ainda mais alegria. Luty, desde o grupo de dança, uma amizade especial nos acompanha, e mesmo distantes, sabemos que podemos contar uma com a outra! Admiro muito você, e fico vibrando com cada conquista sua! Amo vocês!

Luquinhas, você foi meu presente de 15 anos! Uma pessoa iluminada que coloca alegria no coração de todos por onde passa! Obrigada pelo carinho com que me recebe desde bebezinho! Hoje você está participando de uma conquista minha, mas tenho certeza que participarei de muitas conquistas sua!

Amo Você!

*Ao amor da minha vida, **Wagner***

Lindo, você participou de forma intensa em todos esses 9 anos em minha vida! Sempre me incentivou, apoiou, e me ajudou demais... acho até que seu nome poderia estar no trabalho...(rs), pois tantas foram as colaborações! Todo seu apoio foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

Agora só tenho a agradecer, por tudo que você representa em minha vida, por tudo que aprendemos juntos, e pelas “coisas da vida” que me ensina! Você realmente é iluminado, uma pessoa batalhadora, dinâmica, carinhosa, atenciosa, enfim, tudo que admiro! Nessa fase meio tensa do mestrado, você sempre foi companheiro, entendendo as minhas privações... sempre enxergando um futuro melhor para nossas vidas! Colocamos o amor, respeito, carinho, cumplicidade, companheirismo em lugar especial para reger nossa caminhada!

Meu coração só tem alegria ao seu lado e nossa sintonia nos move em direção à evolução conjunta!

Te amo muito!

*AOS meus avós **Milena e Antônio, Dirce e Jayme** (in memorian)*

Foram exemplos de batalhadores e mesmo que por um período curto, participaram da minha vida na infância e adolescência contribuindo para minha formação.

“Vó Milena”, um exemplo de força, admirável! Meu coração se enche de emoção pelas maravilhosas lembranças que tenho dessa avó tão carinhosa e amada!

“Vô Tunico”, sempre firme na intenção de educar! São muitas histórias engraçadas das artes que fazíamos e você tentava nos corrigir.

“Vó Dirce”, só tinha alegria quando ia visitá-la! Adorava quando você nos deixava comer as bobeiras que os pais não deixavam, tenho ótimas lembranças.

“Vô Jayme”, conheci através das histórias esse homem tão honesto!

Hoje só tenho a agradecer a todos vocês, que me deram os presentes mais importantes da minha vida, meu pai e minha mãe! E tenho certeza que de onde estão, continuam nos ajudando sempre..

Amo vocês!

*AOS meus padrinhos **Eleni e José Carlos***

Tio Zé e tia Ní, vocês foram meu segundo pai e segunda mãe!

Em toda minha vida me acompanharam de perto, com muito carinho, atenção e amor! Tenho muita sorte por Deus colocar em minha vida pessoas tão iluminadas! Hoje só tenho a agradecer por sempre me incentivarem, pelo apoio e pelos elogios. Obrigada por cada momento que passamos juntos, nas comemorações, mas também nos momentos menos felizes de dificuldade.

Vocês são o exemplo da convivência com amor!

Vocês são muito importantes em minha vida!

Amo vocês!

À Shirley, minha Tata e Aloísio

Muitos foram os anos de dedicação e paciência para que eu fosse bem cuidada, e não foi pouca paciência...(rs). Tata, mesmo longe fisicamente todos esses anos, continuamos entrelaçadas por nossos corações! Essa ligação me dá muita alegria e a certeza de que nada acontece por acaso em nossas vidas... Você foi um anjo da guarda pra mim! Hoje, tenho a oportunidade de agradecer toda sua dedicação e amor! Obrigada por todas as visitas, de todos esses anos! Cada vez que nos vemos, sinto imensa alegria... Muito obrigada por contribuir de forma tão intensa para minha formação pessoal... Admiro muito você! Em todos os anos que morou comigo, me cuidou como mãe... Não tenho palavras para agradecer toda dedicação que recebi! Que Deus continue iluminando seu caminho e que você continue ser a alegria para muitas pessoas como é para mim! Te amo muito!

Aloísio, muito obrigada pelo carinho e por cuidar dessa pessoa tão especial! Você é uma pessoa privilegiada por ter a Tata como companhia! Adorei conhecer você! Que Deus abençoe suas vidas!

Agradecimentos
Especiais

À minha orientadora

Profa. Dra. **Cristina Antoniali Silva**

Nesse momento especial, quero demonstrar toda minha admiração e alegria por ter encontrado uma pessoa tão especial em meu caminho! Uma orientadora que fez jus ao título! Sempre me acompanhou com toda paciência do mundo, humildade e serenidade! Uma pessoa dedicada que apesar de muitos compromissos da faculdade e da família, sempre encontrou um tempinho para todos orientados! Ensinou-me o tempo todo, até mesmo sem saber, com exemplos no dia-a-dia...

Uma professora admirável, que recebi de presente para me orientar nesse período tão importante da minha vida! Muito obrigada pelo companheirismo...

Essa conquista, que dividimos hoje, iniciou com sua idéia para nossa pesquisa e agora comemoramos juntas o resultado de todo esse tempo de estudo!

Obrigada por acreditar em meu trabalho e me incentivar na realização de meus sonhos! Sou muito grata por todos os ensinamentos! Desejo-lhe ainda mais sucesso e que Deus abençoe seu caminho e de sua família!

Obrigada, de coração!

À minha co-orientadora

Profa. Dra. **Roberta Okamoto**

Conheci mais uma estrela que brilha sem dificuldade alguma. Roberta, admiro muito você! Uma pessoa extremamente calma e paciente. Tudo que aprendi foi prazeroso. Toda mansidão e clareza com que você transmite o conhecimento facilitam o aprendizado! Muito obrigada por tudo! Pelos ensinamentos, pelas conversas nos intervalos, enfim, pela companhia agradável! Desejo que seu caminho seja cercado ainda mais com muito sucesso, alegria e realizações!

Mais uma vez Obrigada!

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

À **Fapesp** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo Nº 2008/01893-0) a pós-graduanda Natalia Manrique Cursino.

À **Capes** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos seis meses de Bolsa de Mestrado a pós-graduanda Natalia Manrique Cursino.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria**, nas pessoas de seu ex - Coordenador Prof. Adj. **Robson Frederico Cunha** e atual Coordenador Prof. Adj **Alberto Carlos Botazzo Delbem** e de todo corpo docente pela contribuição na minha formação.

A todos **docentes e funcionários da disciplina de Odontopediatria** pela contribuição para minha formação.

A todos os pós-graduandos da família da **Odontopediatria**. Muito obrigada pela convivência que, apesar de esporádica, bastante feliz em clínica ou na Bebê-Clínica e nos momentos de confraternização!

Às minhas companheiras de pós-graduação: **Dani, Emilene, Fabíola, Jorgiana e Lílian**. Obrigada pela convivência, mesmo que não tão frequente, muito agradável! Adorei conhecer vocês meninas! Sucesso!

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, todos os professores e funcionários que fizeram parte dos meus dias na realização desse trabalho. Obrigada pela preocupação e agradável convivência!

Ao **Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica**, todos os professores e funcionários que fizeram parte dos meus dias na realização de uma parte desse trabalho. Em especial ao **Marcelinho** que me ensinou uma parte técnica do trabalho com toda alegria e dedicação sempre! Obrigada!

Ao **Departamento de Clínica Integrada e Cirurgia**, todos os professores e funcionários que fizeram parte dos meus dias na realização de uma parte desse trabalho. Em especial à **Dirce, Gilmar e Paulo** pela enorme ajuda e por me acolherem tão bem! Obrigada por tudo!

Aos funcionários da Biblioteca desta faculdade, em especial à **Ana Cláudia, Ana Paula, Cláudio, Luzia e Ivone**, que sempre me atenderam com muito profissionalismo, eficiência, paciência e simpatia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, **Valéria e Diogo**, por terem me orientado sempre com paciência, sorriso nos lábios e um bom-humor admirável... Vocês foram fundamentais para o prosseguimento dos nossos trabalhos. Muito obrigada!

Ao funcionário do Departamento de Ciências Básicas, **Arnaldo**
Um exemplo de profissional dedicado! Muito obrigada por cuidar de meus animais experimentais com muita dedicação, sempre muito dedicado. Obrigada pela conversas e conselhos! Que Deus o abençoe.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp, **Alan, Sr. Camilo e Sr. João Batista** pela disponibilidade em ajudar sempre. Obrigada!

À secretária do Departamento de Ciências Básicas **Lourdes Prando**
Pela disponibilidade e orientações. Sempre que precisei pude contar com você! Muito obrigada!

Ao Professor **Tetuo Okamoto**

Muito obrigada pela ajuda na cirurgia e análise de parte desse trabalho. Agradeço pela amizade, pelo tratamento carinhoso e por sempre estar disposto a ajudar. Tenho muita admiração pelo exemplo de profissional e de dedicação à pesquisa que demonstra ser. Muito obrigada pela contribuição através de seus ensinamentos!

À professora **Sílvia Perri**

Por toda ajuda na parte estatística desse trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade em ajudar!

Ao professor **Antônio Augusto**

Pela contribuição neste trabalho! Muito obrigada pelas explicações sempre pacientes e pelo carinho que demonstra por mim. Foi muito bom conviver um pouco mais com um professor que há pouco tempo contribuiu com minha formação na graduação e agora para o mestrado! Obrigada!

À professora **Leda**

Pela disponibilidade em sempre ajudar quando foi preciso, por todas as dúvidas que esclareceu. Pelo empréstimo da famosa escadinha de alumínio. Muito obrigada pelo carinho e agradável convivência!

Ao amigo e companheiro de mestrado **Cassiano**

Hoje é a minha vez de agradecer! Minha caminhada no mestrado é dividida antes e após o Cassiano. Meu primeiro ano de trabalho foi bastante cansativo. Depois que você apareceu, além da imensa ajuda na pesquisa, o ambiente ficou mais alegre! Você sabe promover o sorriso, transmitindo alegria por onde passa! Aprendi demais nesse curto tempo com nossos trabalhos e conversas! Obrigada pela amizade e intensa colaboração nesse trabalho! O sentimento que você expressou na sua defesa é recíproco, também te considero demais!

À amiga **Natália Pola**

Pelo companheirismo de todos esses anos de intensa convivência! Naty, em todos os momentos aprendi muito com você, tanto na parte profissional quanto na vida fora da faculdade! Aprendi o que é ter uma irmã, dividindo o quarto, compartilhando momentos muitas vezes 24h juntas! Companheiras para a vida toda, em momentos de alegria e de dificuldades. Todos os obstáculos que enfrentamos juntas se transformaram em aprendizado e as alegrias ficaram em nossos corações como troféus! Sua serenidade ensina sem precisar de palavras. Obrigada pela amizade, conselhos, consolos, ajudas, carinho, sinceridade, lealdade, cumplicidade, enfim, por tudo!!!

À amiga **Talita**

Apesar do pouco tempo, nossa amizade parece ser de longa data! Esse seu jeito calmo transmite muita paz... e mesmo sem perceber transforma o ambiente em clima agradável! Muito obrigada pelas conversas e pelo carinho!

À **Néia e Wagner**

Por terem me acolhido como filha, por todo cuidado que dedicaram a mim. Por todas as maravilhosas refeições que fizemos juntos, principalmente quando estava sozinha nos finais de semana. Considero vocês parte da minha família! E mesmo sem intenção me deram um maravilhoso presente, com que vou construir a minha família: Wá! Muito obrigada!!!

Aos meus queridos primos, primas, tio e tia: **Ângelo, Elizete, Josi, Kleber, Maira, Mirah, Milena, Dico, Lavínia, Fernando e Telma.**

Por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal! De forma direta ou indireta vocês foram imprescindíveis! Cada conversa, cada conselho, cada reunião familiar acrescentou muita alegria em minha vida. Sou muito feliz por ter uma família tão especial! Muito obrigada!

À Pâmela Izza

Por todo apoio e dedicação na última parte desse trabalho! Foi muito bom contar com a ajuda de uma pessoa tão querida e conviver de forma mais frequente com uma amiga que admiro muito. Muito obrigada!

À Paulinha

Por toda ajuda na parte técnica da imunoistoquímica. Com você pude aprender muito! E ainda tive a oportunidade de aproveitar uma convivência bastante agradável! Obrigada!

Aos estagiário de Iniciação Científica **Lourdes e Samuel**, que contribuíram efetivamente para a realização desse trabalho! Muito obrigada por cada conversa, cada ajuda. Essa conquista também é de vocês! Desejo muito sucesso em suas vidas!

Aos meus companheiros de todos os dias do Departamento de ciências Básicas: **Adriano, Ariane, Bruna Alves, Caril, César, Dani Bertucci, Dani Picco, Daniel Bernabé, Deise, Elisa, Felipe, Gean, Leo, Natalia Colombo, Samuel, Simone, Talita, Vanessa e Wagner**. Todos vocês contribuíram para esse trabalho, seja de forma direta ou indireta! Muito obrigada por toda ajuda e companheirismo!

Às minhas companheiras de república (em diferentes períodos): **Ana Carol, Ana Luiza, Aninha, Bruna, Aline Ursula, Carol Vital, Cris, Dani Michelini, Jéssica, Jorgiana, Naty Pola, Naty (Andradina), Pâmela, Paula, Tamara, Valéria**. Muito obrigada pelo carinho, respeito e amizade construída nesse período! Desejo a vocês uma vida de realizações!

Às minhas sempre amigas: **Mayra, Carol, Vânia, Vanessa, Vivi, Vanessa Jacob, Gra Demartini**. Pode passar o tempo que for, quando nos vemos tudo continua igual! Sempre muita alegria! Tenho muita saudade... Sucesso sempre!

Às minhas amigas desde a graduação **Nairana, Naty Campos, Naty Pola, Nilva, Sabrina, Tamara**. Cada uma tem lugar especial em meu coração! Sempre de bem com a vida, alegres, muito queridas! Tenho muita gratidão pelo carinho, muita alegria das lembranças felizes... Saudades sempre! Obrigada por cada diálogo, cada momento que compartilhamos, enfim, por tudo!

À minha amiga **Marli de Angeli**

Sou muito grata por todos esses anos que me cuidou com tanto carinho! Todo esse cuidado me proporcionou tranquilidade para me dedicar ao estudo. Você é uma pessoa especial! Muito obrigada de coração!

A todos os **pacientes e seus pais ou responsáveis**, pela confiança depositada em cada atendimento, pela alegria do olhar de cada criança... Enfim, muito obrigada pela contribuição para minha formação!

A todos aqueles que, no anonimato, me promoveram um ambiente agradável em Araçatuba, e que, direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Aos **animais** que sublimaram a própria vida por um bem maior.

Epígrafe

Sem atalhos mergulhei pelos caminhos do saber.

Conheci a inquietude, o descontentamento, mas também o fascínio irresistível do maravilhoso.

Pequeno ante o grandioso, grande ante a pequenez do espírito e a pretensa força dos poderosos, de tudo procurei me aproximar, tangido pela atração do desconhecido, do irrealizado.

Não haveria contudo, atalho ou caminho, não estivesse em mim a força irresistível do prazer em percorrê-lo.

Leonardo da Vinci

Resumo

Cursino NM. Avaliação do efeito do atenolol no processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) [dissertação]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

A hipertensão arterial representa um fator de risco sistêmico e condição desfavorável para tratamentos dentários, especialmente aqueles que necessitam de reparação óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e o efeito do atenolol sobre este processo. Wistar e SHR tratados ou não com 100mg/kg/dia (atenolol), foram submetidos à extração do dente incisivo superior direito e sacrificados aos 7, 14, 21, 28 e 42 dias após a cirurgia. As hemi-maxilas foram removidas e as imagens radiográficas foram realizadas. A análise radiográfica foi obtida por meio do sistema digital Digora. Análises histológicas, histomorfométricas e reações imunoistoquímicas foram feitas em cortes histológicos de 5µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina ou submetidos à imunomarcação para RANK, RANKL, OPG e proteínas MMP-9. A análise histológica foi realizada por microscopia óptica e a análise histomorfométrica pelo software RGB / Leica Qwin Color. Os resultados densitométricos e histomorfométricos foram analisados pela Anova *two-way*. Na análise imunoistoquímica, utilizando um microscópio óptico, foram atribuídos *scores* às imagens. Os resultados foram analisados pelos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Mann Whitney. As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Redução da densidade mineral óssea (DMO), menor porcentagem de osso e menor espessura do trabeculado ósseo foram observadas nos períodos finais do reparo alveolar em SHR. Aumento da imunomarcação para RANKL, RANK e MMP-9 foi observado em 28 dias após a cirurgia no alvéolo em SHR. Consistente efeito do atenolol foi observado no reparo alveolar de ratos hipertensos. O atenolol aumentou a DMO observada na maioria dos períodos analisados e aumentou a espessura do trabeculado ósseo nos 28º e 42º dias em alvéolos de SHR. Aumento na marcação para OPG aos 7º e 42º dias do reparo foram observados em SHR tratados. Aumento na expressão de RANKL e MMP-9, aos 21º e 42º dias, e também aumento da expressão de RANK ao 21º dia foram observados em alvéolos de SHR

tratados com atenolol. Nossos dados sugerem que o atraso no reparo alveolar observado em SHR estaria associado ao aumento do tônus simpático periférico descrito nestes animais. Neste atraso, alterações na formação e remodelação óssea alveolar estariam associadas à expressão diferencial de proteínas do metabolismo ósseo OPG, RANKL, RANK e MMP-9, a qual é modulada pelo efeito do atenolol.

Palavras-chave: Processo alveolar. Ratos endogâmicos SHR. Atenolol. Hipertensão. Imunoistoquímica. Densidade Óssea.

Abstract

Cursino NM. Evaluation of atenolol effect in alveolar healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR) [dissertation]. Araçatuba: Unesp – São Paulo State University; 2010.

ABSTRACT

Hypertension represents a systemic risk factor and unfavorable condition for dental treatments, especially treatments that require bone healing. The purpose of this study was to evaluate the alveolar wound healing in spontaneously hypertensive rats (SHR) and the atenolol effect on this process. Normotensive Wistar rats and SHR, untreated or treated with atenolol (100mg/kg/day), were submitted to the extraction of the upper right incisive tooth and sacrificed at 7, 14, 21, 28 and 42 days after surgery. The hemi-jaws were extracted and the radiographic images were obtained. Radiographic analysis was performed by using the digital system Digora. Histological, histomorphometric and immunohistochemical reactions were done in histological sections, 5 µm thick, stained with hematoxylin and eosin or subjected to immunolabeling to RANK, RANKL, OPG and MMP-9 proteins. Histological analysis was performed by light microscopy and histomorphometric analysis by Leica Qwin Color/RGB software. The densitometric and histomorphometric results were also analyzed by two-way ANOVA. In immunohistochemical analysis, using an optical microscopy, scores were assigned to the images. Results were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann Whitney statistical tests. Differences between results were considered significant when $p < 0.05$. Reduced bone mineral density (BMD), lower bone percentage and less thickness of trabecular bone was observed in the final periods of alveolar bone healing in SHR. Increased RANKL, RANK and MMP-9 immunolabeling were observed at 28 days after surgery in SHR alveolus. Consistent atenolol effect was observed on alveolar bone healing of hypertensive rats. Atenolol increased the BMD observed in most of the periods analyzed and increased trabecular bone thickness at 28 and 42 days in SHR alveolus. Increased OPG immunolabeling at 7 and 42 days of alveolar healing were observed in treated SHR. Increased expression of RANKL and MMP-9 at 21 and 42 days, and increased RANK expression at 21 day was also observed in alveolus of SHR treated with atenolol. Our results suggested that the delay in alveolar healing observed in SHR

was associated with increased peripheral sympathetic tone described in these animals. This delay, changes in alveolar bone formation and remodeling would be associated with differential expression of proteins in bone metabolism OPG, RANKL, RANK and MMP-9, which is modulated by the effect of atenolol.

Key-words: Alveolar process. Rats, inbred SHR. Atenolol. Hypertension. Immunohistochemistry. Bone Density.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequência das etapas da exodontia.	59
Figura 2 – Imagem radiográfica do alvéolo dentário indicando a área onde foi analisada a DMO (densidade mineral óssea) no terço médio do alvéolo pelo software Digora.	61
Figura 3 – Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de SHR ao 21º dia pós-cirúrgico. Tecido ósseo corado em azul pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)	65
Figura 4 – Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de Wistar ao 14º dia pós-cirúrgico. Marcação da espessura das trabéculas em verde pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)	65
Figura 5 – PAS de ratos Wistar (círculos abertos), Wistar tratado com atenolol (círculos fechados), SHR (quadrados abertos) e SHR tratado com atenolol (quadrado fechado).	68
Figura 6 – Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S).	70
Figura 7 – Terço médio do alvéolo de Wistar mostrando trabéculas ósseas delgadas e espessas. 7 dias.	73
Figura 8 – Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S).	75
Figura 9 – Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S).	77
Figura 10 – Imagens histológicas das reações de imunoistoquímica contra a proteína OPG no terço médio do alvéolo em ratos.	79

Figura 11 – Imagens histológicas das reações de imunoistoquímica contra a proteína RANKL no terço médio do alvéolo em ratos.	80
Figura 12 – Imagens histológicas das reações de imunoistoquímica contra a proteína RANK no terço médio do alvéolo em ratos.	81
Figura 13 – Imagens histológicas das reações de imunoistoquímica contra a proteína MMP-9 no terço médio do alvéolo em ratos.	82
Figura 14 – Gráficos da análise da imunomarcacão para OPG durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR.	83
Figura 15 – Gráficos da análise da imunomarcacão para RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR.	84
Figura 16 – Gráficos da análise da imunomarcacão para OPG e RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR.	85
Figura 17 – Gráficos da análise da imunomarcacão para RANK durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR.	86
Figura 18 – Gráfico da análise da imunomarcacão para MMP-9 durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR.	87
Figura 19 – Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT).	89
Figura 20 – Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST).	90
Figura 21 – Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT).	91
Figura 22 – Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST).	92

Figura 23 – Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT).	94
Figura 24 – Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST).	95
Figura 25 – Gráficos da análise da imunomarcção para OPG durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B).	98
Figura 26 – Gráficos da análise da imunomarcção para RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B).	99
Figura 27 – Gráficos da análise da imunomarcção para RANK durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B).	100
Figura 28 – Gráficos da análise da imunomarcção para MMP-9 durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B).	101

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Densidade mineral óssea do terço médio de ratos Wistar e SHR.	70
Tabela 2 – Percentual de tecido ósseo em ratos Wistar e SHR.	75
Tabela 3 – Espessura do trabeculado ósseo em ratos Wistar e SHR.	76
Tabela 4 – Expressão da proteína OPG em ratos Wistar e SHR.	83
Tabela 5 – Expressão da proteína RANKL em ratos Wistar e SHR.	84
Tabela 6 – Expressão da proteína RANK em ratos Wistar e SHR.	86
Tabela 7 – Expressão da proteína MMP-9 em ratos Wistar e SHR.	87
Tabela 8 – Densidade mineral óssea do terço médio de ratos Wistar e Wistar + atenolol.	88
Tabela 9 – Densidade mineral óssea do terço médio de SHR e SHR tratados com atenolol.	89
Tabela 10 – Percentual de tecido ósseo em Wistar e Wistar tratado com atenolol.	91
Tabela 11 – Percentual de tecido ósseo em ratos SHR e SHR tratado com atenolol.	92
Tabela 12 – Espessura do trabeculado ósseo em ratos Wistar e Wistar tratado com atenolol.	93

Tabela 13 – Espessura do trabeculado ósseo em ratos SHR e SHR tratado com atenolol.	95
Tabela 14 – Expressão da proteína OPG em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol.	98
Tabela 15 – Expressão da proteína RANKL em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol.	99
Tabela 16 – Expressão da proteína RANK em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol.	100
Tabela 17 – Expressão da proteína MMP9 em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol.	101

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal.	128
Anexo B – Artigo enviado para publicação.	129

*Lista de
Abreviaturas
e Símbolos*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Por cento

± - Desvio padrão

< - menor

cm - centímetro

DAB - Diaminobenzidina

DMO - Densidade Mineral Óssea

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

EPM - Erro padrão da média

Fig. - Figura

Figs - Figuras

FOA - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g - grama

h - hora

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina e eosina

kg - quilograma

kvp - quilovolts pico

LTDA. - Limitada

mA - miliampères

M-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

mg - miligrama

mL - mililitro

mmHg - milímetros de mercúrio

MMP-9 - Metaloproteinase-9

n - tamanho da amostra

NaOH - Hidróxido de sódio

°C - Graus Celcius

OPG - Osteoprotegerina

P - Probabilidade do valor do teste

PAS - Pressão Arterial Sistólica

PBS - Tampão fosfato salina

pH - potencial hidrogeniônico

pi - pixel

RANK - Receptor Ativador Nuclear Kappa- β

RANKL - Receptor Ativador Nuclear Kappa- β Ligante

s - segundo

S - SHR

SHR - Spontaneously Hypertensive Rats

SHRT - SHR tratado

TRAP - Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

Unesp- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

W - Wistar

WT - Wistar tratado

x - vezes

μm – Micrometro

Sumário

SUMÁRIO

1 Introdução	44
2 Proposição	54
3 Materiais e Métodos	56
4 Resultados	67
5 Discussão	102
6 Conclusão	111
Referências	113
Anexos	127

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Reparo Alveolar

Embora a odontologia preventiva tenha adquirido elevada importância nos últimos anos, em algumas situações clínicas específicas, como nos casos de cáries e doenças periodontais graves, fraturas, razões ortodônticas, dentes em má oclusão, entre outras, há a necessidade de se remover alguns dentes (PETERSON, 2000). A partir do momento que o diagnóstico é realizado e o plano de tratamento instituído é a exodontia, vários fatores devem ser considerados, uma vez que eles podem determinar alterações no processo de reparo alveolar. Com a remoção de um dente, a ferida cirúrgica deverá ser necessariamente reparada com tecido ósseo capaz de suportar as pressões exercidas pelo sistema mastigatório, que preencherá todo o espaço anteriormente ocupado pelo dente e tecidos de sustentação. Um conjunto de reações será desencadeado no interior do osso alveolar, através da mesma seqüência de resposta de cicatrização do organismo, salvas algumas particularidades.

O estudo do processo de reparo do alvéolo dental tem sido realizado em cães (CLAFLIN, 1936; HUEBSCH; HANSEN, 1969), em ratos (ASTRAND; CARLSSON, 1969; JOHANSEN, 1970; PIETROKOVSKI; MASSLER 1967; TODO, 1968) em porcos (JOHANSEN; GILHUUS-MOE, 1969), macacos (PIETROKOVSKI; MASSLER, 1971; SIMPSON, 1969) e no homem (AMLER, 1977; AMLER ET AL., 1960) levando os pesquisadores a definir, cronologicamente, as reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo após a extração dental, desde o seu completo preenchimento por sangue até a sua reparação óssea total.

O processo de reparo do alvéolo dental se inicia imediatamente após a extração dental. A hemorragia, resultante do rompimento do feixe vascular do ápice dental e de vasos do ligamento periodontal, forma o coágulo sanguíneo. Este é gradualmente invadido por fibroblastos, originados em sua maioria por mitose e/ou por diferenciação de células indiferenciadas presentes no ligamento periodontal e também por capilares neoformados. O tecido conjuntivo formado mostra-se rico em células e vasos e apresenta intensa síntese de fibras e substância fundamental amorfa pelos fibroblastos. Numa etapa seguinte, o tecido conjuntivo apresenta evidências de maturação, com gradual diminuição do número de células e vasos

sanguíneos, aumentando progressivamente a quantidade de fibras colágenas (CARVALHO; OKAMOTO, 1978).

Todo (1968), em seu estudo sobre a resposta proliferativa inicial do processo de reparo alveolar em rato, observou que os fibroblastos e as células endoteliais migravam do periodonto gengival para as margens da ferida de extração dental e que essas células também estavam presentes nos remanescentes do ligamento periodontal. Ao observar a proliferação periostal próxima às margens do alvéolo, verificou células lábeis um dia após a extração, assemelhando-se, essas células, aos osteoblastos e células progenitoras responsáveis pela neoformação óssea da região.

Astrand e Carlsson (1969) observaram em alvéolos de ratos que ao segundo dia havia um preenchimento central por coágulo sanguíneo e perifericamente, por um novo tecido conjuntivo em organização. Johansen (1970) sugeriu que a proliferação de células endoteliais, adventícias e sanguíneas mononucleares pudesse fazer parte da formação do tecido de granulação no alvéolo e que tais células poderiam ser provenientes dos remanescentes da membrana periodontal. Segundo Okamoto e Russo (1973), ao quarto dia pós-operatório, o tecido conjuntivo pode ser observado. Ao sétimo dia pós-operatório, a neoformação óssea estaria presente em grande parte do alvéolo de rato, estando este totalmente preenchido por osso ao 16º dia (ASTRAND; CARLSSON, 1969). Ao 22º dia, os autores não conseguiram distinguir o limite entre o osso neoformado e a parede alveolar.

A fase de diferenciação óssea ou mineralização é iniciada posteriormente a fase de maturação do tecido conjuntivo, por volta do sétimo dia pós-operatório. Os osteoblastos depositam matrizes orgânicas a partir do fundus alveolar formando um tecido osteóide. A seguir, com a calcificação do tecido osteóide, são construídas as trabéculas ósseas. Considera-se completa a reparação do alvéolo quando este se encontra totalmente preenchido pelo tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada, processo observado a partir do 21º dia pós-exodôntico em rato (HADDAD et al., 1965), ao 48º dia no cão e ao 64º dia na espécie humana (CARVALHO et al., 1983). Qualquer fator que altere a seqüência morfológica descrita acima poderá alterar a cronologia ou a qualidade do tecido ósseo a ser formado.

Assim, a proliferação celular, o desenvolvimento do tecido conjuntivo, a maturação desse tecido conjuntivo e a diferenciação óssea ou mineralização são quatro fases fundamentais identificadas morfolologicamente durante o reparo alveolar (SIMPSON, 1960). Outros pesquisadores (PIETROKOVSKI; MASSLER, 1967)

dividem o reparo alveolar em ratos em três fases principais: fase inicial (1 a 5 dias), na qual a organização do coágulo seria completada e o alvéolo seria parcialmente coberto por epitélio; fase de formação óssea (5 a 20 dias) e fase de remodelação óssea (20 a 60 dias), na qual o osso jovem sofre maturação e a crista alveolar é remodelada.

Alterações no reparo alveolar

O processo de reparo alveolar após extração dental tem sido bastante estudado por meio de métodos histológicos e radiográficos em humanos (AMLER et al., 1960; BOYNE, 1966; CRESPI et al., 2009; DEVLIN; SLOAN, 2002; SALDANHA et al., 2006; VAN DER WEIJDEN et al., 2009) e em animais (GORUSTOVICH et al., 2008; MENDES et al., 2008).

Ocorrendo na cavidade bucal, o processo de reparo pode sofrer alterações devido a fatores locais e sistêmicos. Tem sido sugerido que fatores como o procedimento cirúrgico empregado, o anestésico local, diferentes medicamentos e materiais aloplásticos utilizados e as complicações pós-operatórias, como a alveolite, atrasam a cronologia do reparo alveolar (CARVALHO; OKAMOTO, 1978; CARVALHO et al., 1983, SAAD NETO et al., 1982). Condições fisiológicas e patológicas como gravidez (SANCHES, 1983), desidratação (CABRERA, 1982), estresse (RESENDE; OKAMOTO, 1989), anemia (GIGLIO et al., 2000), diabetes (GRANDINI, 1978; GRANDINI et al., 1970), nicotina (PINTO et al., 2002), hipofunção da glândula salivar (DAYAN et al., 1992) apresentaram efeitos diretos na cavidade oral e também alteraram o processo de reparo alveolar em humanos ou em animais. Outros fatores que interferem no processo de reparo alveolar são a idade (AMLER, 1977), o uso de corticóides (SMALES, 1978), anticoncepcionais (CARVALHO; OKAMOTO, 1981) e deficiências nutricionais (SMITH, 1975).

Entre os fatores listados acima, poderia ser incluída a hipertensão arterial, uma vez que sua ocorrência determina uma série de alterações fisiológicas que são lesivas ao organismo quanto maior sua intensidade e duração (TARAZI; GRIFFORD, 1983).

Na literatura são encontrados dois estudos que avaliaram o efeito da hipertensão sobre o reparo alveolar após exodontia em animais experimentais. Murata et al., (1967 apud CARVALHO et al., 1983) estudaram o processo de reparo alveolar após extração de pré-molares em cães com hipertensão induzida por

alteração da atividade renal e sugeriram que, neste modelo experimental, o atraso na cronologia do processo, seria diretamente proporcional à intensidade do efeito pressor. Carvalho et al. (1983), sugeriram que a hipertensão estaria associada a um avanço na reparação tecidual observada até o sexto dia após a extração dos dentes incisivos superiores de ratos hipertensos 1 Rim-1 Clip, nos quais a hipertensão também é induzida por redução de perfusão renal. No entanto, estes autores descreveram que a qualidade de osso formado até o 21^o dia pós-exodontico não foi semelhante ao observado em animais normotensos, ou seja, neste período o alvéolo estava preenchido por tecido ósseo imaturo. Em ambos os estudos, os resultados obtidos apontam para uma alteração do processo de reparo alveolar associada à hipertensão.

No entanto, esses resultados não forneceram dados sobre os possíveis mecanismos envolvidos no efeito da hipertensão sobre o processo de reparo alveolar.

Hipertensão e alterações em tecidos mineralizados

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são responsáveis por 16,7 milhões de mortes por ano e a hipertensão arterial é responsável por aproximadamente 7,1 milhões de mortes prematuras por ano, o que representa 13% do total geral de óbitos (WHITWORTH et al., 2003). A hipertensão arterial também é apontada como causa de 25% da etiologia multifatorial da cardiopatia isquêmica e 40% dos acidentes vasculares cerebrais, e no Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos com causas conhecidas (PASSOS et al., 2006). Vários estudos têm indicado que tanto no Brasil como no mundo, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte (LOUTZENHISER et al., 2002; MANCIA; GRASSI, 1998; MUNTNER et al., 2002). Uma pesquisa do Ministério da Saúde (MS) feita com 54 mil adultos revela que a prevalência da hipertensão aumentou, de 21,5%, em 2006, para 24,4%, em 2009 (BRASIL, 2010).

Diversas são as causas envolvidas na fisiopatologia da hipertensão arterial, entretanto, a grande maioria dos pacientes (90%) são ainda considerados hipertensos primários ou essenciais, enquanto que os demais dez por cento apresentam hipertensão secundária, resultante de doenças do parênquima renal, doenças vasculares e de lesões de glândulas adrenais. A patogênese da hipertensão

arterial essencial é, em grande parte, indefinida, multifatorial e altamente complexa (YE et al., 2000). Há indicações de que a hipertensão essencial do adulto teria sua origem na criança. Abaixo dos dez anos de idade, a hipertensão arterial geralmente (90% dos casos) é secundária, sendo na maioria das vezes devido à doença renal. A hipertensão arterial essencial predomina acima dos dez anos, com níveis pressóricos não muito elevados, no percentil 95 ou discretamente acima dele. A prevalência da hipertensão arterial na criança/adolescente situa-se entre 0,8% a 9%, média de 5%, com significativa elevação na população obesa (SANTOS et al., 2003).

Diferentes estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a hipertensão estaria associada a efeitos prejudiciais na qualidade e densidade de tecidos ósseos (AFGHANI; GORAN, 2007; IZAWA et al., 1985; VESTERGAARD et al., 2009). Entre eles, muitos têm mostrado que ratos espontaneamente hipertensos apresentam alterações importantes de metabolismo ósseo, como aumento no *turnover* ósseo e redução na massa óssea cortical e trabecular (IZAWA et al., 1985; BARBAGALLO et al., 1991; WANG et al., 1993).

O rato espontaneamente hipertenso (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR), é um dos modelos mais usados para o estudo da hipertensão arterial. Estes animais nascem normotensos e a partir da 8ª semana de nascimento desenvolvem espontaneamente ou sem uma causa pré-determinante, um aumento de pressão arterial, acima de 150mmHg, que se mantém por toda a vida do animal (OKAMOTO; AOKI, 1963). Lucas et al. (1986) demonstraram que ratos SHR com idade de 23 semanas apresentam alteração óssea caracterizada por menor densidade óssea do fêmur (expressa pela média do conteúdo mineral por espessura do fêmur). Naito et al. (1993) demonstraram que a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur está diminuída em SHR-SP (6 a 36 semanas). Pereira et al. (2007) também observaram menor DMO do fêmur de SHR. Estas alterações não seriam específicas ao fêmur, uma vez que Inoue et al. (1995) demonstraram que SHR, machos, fêmeas, jovens e velhos apresentam menor DMO na região proximal da tíbia (rica em osso trabecular) que ratos normotensos.

Considerando a alta prevalência de pacientes hipertensos e a importância do osso alveolar para áreas da clínica odontológica como implantodontia e periodontia, foram feitos estudos do osso alveolar em ratos SHR. Leite et al. (2005) demonstraram que a perda óssea devido à doença periodontal é maior em SHR do

que nos ratos normotensos Wistar, condição associada ao maior número de neutrófilos e de osteoclastos presentes no local. Corroborando este resultado, recentemente Bastos et al. (2010) demonstraram que a maior perda óssea e diminuída densidade óssea decorrente da doença periodontal em SHR se deve a maior expressão da proteína RANKL em relação à expressão de OPG, e ao elevado número de células TRAP positivas no osso alveolar destes animais. Como RANKL e OPG são importantes proteínas envolvidas no metabolismo ósseo, e a TRAP, um marcador de osteoclastos (reabsorção óssea), os autores sugeriram que a maior perda óssea observada em SHR estaria associada a alterações no *turnover* ou remodelação óssea.

As proteínas OPG, osteoprotegerina ou fator inibitório da osteoclastogênese, RANK, receptor ativador do fator nuclear- κ B e seu ligante RANKL são mediadoras de vários processos celulares, incluindo o metabolismo ósseo. No osso, osteoblastos regulam a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea ao produzirem OPG e RANKL. Possíveis modificações na integração entre as proteínas OPG, RANK e RANKL levariam a alteração na qualidade do tecido mineralizado formado (SIMONET et al., 1997). Na membrana de células da linhagem de osteoclastos e em células dendríticas está presente a RANK (SUDA et al., 1999), proteína receptora responsável pelo controle da osteoclastogênese (KENEDA et al., 2000) e metabolismo do cálcio. Recentemente, a presença de RANK foi demonstrada também em osteoblastos (SOUZA et al., 2010). O ligante da RANK, RANKL, é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo e pelos linfócitos T ativados e pode promover a reabsorção óssea ao ligar-se à RANK na superfície de pré-osteoclastos, estimulando sua diferenciação e ativação em osteoclastos. A OPG (SHALHOUB et al., 1999; SUDA et al., 1999), uma proteína também produzida por osteoblastos e células do estroma ósseo, é capaz de se ligar a RANKL impedindo sua ligação a RANK. Ligando-se à RANKL, a OPG inibe a maturação dos osteoclastos, contendo assim a osteoclastogênese e o desenvolvimento de linfócitos.

A polpa dental e culturas celulares de odontoblastos também expressam OPG, RANKL e M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos). *In vivo*, RANKL e OPG foram localizadas em odontoblastos, ameloblastos e células de polpa de dentes em desenvolvimento de camundongos (RANI; MACDOUGALL, 2000), assim como no botão epitelial, nos epitélios internos e externos e no mesênquima da papila dental

(OHAZAMA et al., 2004), sugerindo a participação destas proteínas no desenvolvimento dental.

Coutinho (2005) estudou e demonstrou a expressão de OPG, RANKL, RANK em células e no tecido conjuntivo presente nos diferentes períodos de reparo em alvéolos de ratos Wistar. Recentemente, Luvizuto et al. (2010) sugeriram que o atraso do reparo alveolar observado em ratas wistar ovariectomizadas estava associado à alteração na expressão de OPG e RANKL nos diferentes períodos do reparo.

Modificações na integração das proteínas OPG/RANK/RANKL com consequente alteração na formação e remodelação óssea, têm sido também associadas ao uso de medicamentos anti-hipertensivos, como os antagonistas de receptores β -adrenérgicos (ELEFTERIOU et al., 2005; SATO et al., 2010; TAKEDA et al., 2002). As primeiras evidências experimentais do efeito destes medicamentos foram obtidas a partir de estudos em modelos experimentais de defeitos ósseos criados no terço médio da diáfise femoral e subsequente preenchidos com matriz óssea desmineralizada, nos quais o tratamento com baixas doses de propranolol por 19 dias consecutivos aumentou o índice de aposição mineral do tecido esponjoso ou trabecular, aumentou o calo ósseo e união óssea (MINKOWITZ et al., 1991). Também foi observado que, em modelo experimental de perda óssea induzida por ausência de carga mecânica (*tail-suspension*), o tratamento por 30 dias consecutivos com propranolol (5g/L, diluído em água) preveniu a perda óssea associada à falta de carga mecânica (ASSEUR et al., 2003). Estudos clínicos epidemiológicos também demonstraram que o uso de β -bloqueadores, como anti-hipertensivos, estava associado com uma redução de 23-30% no risco de fraturas vertebrais ou não vertebrais (mão, antebraço, pé) em mulheres menopausadas (PASCO et al., 2004; SCHLIENGER et al., 2004). Juntos, estes estudos sugerem que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos estaria diretamente envolvido com ganho de massa óssea, aumento de densidade óssea e formação óssea em animais e em humanos.

A partir destas observações, tem sido sugerido que o *turnover* ou remodelação óssea seria controlado pelo sistema nervoso central, com participação do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) como componente periférico (ELMQUIST; STREWLER, 2005; TOGARI; ARAI, 2008; TOGARI et al., 2005; CHENU;

MARENZANA, 2005) e da leptina como regulador das vias nervosas centrais envolvidas (ELEFTERIOU et al., 2005; TAKEDA et al., 2002). A ativação de receptores β -adrenérgicos em osteoblastos pela noradrenalina, levaria a produção da proteína RANKL que estimularia a formação de osteoclastos. Assim, o efeito dos antagonistas β -adrenérgicos sobre os tecidos mineralizados estaria correlacionado com a redução da formação de osteoclastos, inibindo, desta forma, a reabsorção óssea.

Recentemente, Sato et al. (2010) demonstraram que o tratamento de SHR com baixas doses de propranolol previne a perda óssea e a fragilidade biomecânica naturalmente desenvolvida por estes animais. Este resultado corrobora a sugestão de que os índices reduzidos de formação óssea e aumento da atividade osteoclastogênica observados em SHR, que contribuem para que este modelo experimental de hipertensão seja considerado também um modelo de osteoporose (BARBAGALLO et al., 1991; IZAWA et al., 1985; WANG et al., 1993), estariam associados a uma maior atividade do tônus do SNS (sistema nervoso simpático) periférico (KLEMORA et al., 1999; NAGATSU et al., 1971,1974) descrito anteriormente nestes animais.

Outros mecanismos, não controlados diretamente pelo SNS, poderiam contribuir para as alterações associadas ao metabolismo de tecidos mineralizados em SHR. As metaloproteinases de matriz (MMPs) representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, e participam diretamente de diferentes processos fisiológicos, entre eles a cicatrização de feridas (SOUZA; LINE, 2002).

Foi sugerido que a inibição da MMP-2 e MMP-9 por sais de zinco interfere na remodelação óssea alveolar (Souza et al., 2000), mas a inibição dessas enzimas por minociclina não altera o crescimento dental em ratos (Gerlach et al., 2002). Estas enzimas participam da fase de remodelação após a extração dental promovendo digestão da matriz extracelular provisória para substituição por osso neoformado, e também da fase inicial de formação óssea alveolar, com aumento progressivo da expressão e da atividade de MMP-2 e MMP-9 no período de 3 a 5 dias após a extração dental em ratos (SILVA et al., 2001). Redução na expressão e na atividade de MMP-2 e MMP-9 foram associadas aos efeitos prejudiciais da ciclosporina A

(SILVA et. al, 2001) e da deficiência estrogênica (ZECCHIN et. al, 2005) sobre as fases iniciais do reparo alveolar em ratos machos e fêmeas respectivamente.

Não encontramos na literatura estudos que avaliassem possíveis alterações na expressão das proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9 nas fases de formação e remodelação óssea do processo de reparo alveolar em animais hipertensos. Também não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito de antagonistas β -adrenérgicos sobre o processo de reparo alveolar.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito da hipertensão e do atenolol no processo de reparo alveolar e a participação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo neste processo.

Os experimentos foram realizados com o objetivo de responder as seguintes perguntas:

- 1- O processo de reparo alveolar está alterado em ratos espontaneamente hipertensos?
- 2- As proteínas OPG, RANK, RANKL e MMP-9 participam das possíveis alterações encontradas?
- 3- O tratamento com o anti-hipertensivo atenolol modula as possíveis alterações encontradas?

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais desenvolvidos neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Unesp, de acordo com o protocolo nº 2008-001397. Certificado em anexo (Anexo A).

Animais

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 180 e 230g, com idade entre 2 e 3 meses, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – Unesp. Como controle experimental, foram utilizados ratos Wistar com peso e idade semelhantes aos animais SHR. Os ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA - Unesp. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24° C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) no Biotério do Departamento de Ciências Básicas e foram alimentados com água potável e ração *ad libitum*.

Somente SHR com pressão arterial sistólica maior ou igual a 150 mmHg e ratos normotensos Wistar com pressão arterial sistólica em torno de 112 mmHg foram utilizados nos experimentos.

Medida de pressão arterial

O registro da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizado pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos. A PAS foi aferida nos períodos pré-operatório e pós-operatório em dias determinados nos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) Wistar sem tratamento 2) Wistar tratado com atenolol 3) SHR sem tratamento 4) SHR tratado com atenolol. Para cada grupo, foram avaliados cinco (5) animais em 5 diferentes tempos após a exodontia: 7, 14, 21, 28 e 42 dias.

Tratamento

Ratos Wistar e SHR foram tratados com o anti-hipertensivo atenolol na dose de 100mg/kg/dia por via oral. O tratamento foi iniciado sete (7) dias antes de ser realizada a exodontia e foi mantido após a cirurgia até os períodos determinados para o sacrifício (7, 14, 21, 28 e 42 dias). O atenolol foi diluído em volume de água pré-determinado (50 a 60ml de água/dia) a ser ingerido durante 24 horas (um dia) por rato. Os ratos controles (não tratados) receberam o mesmo volume de água sem a adição de atenolol.

Cirurgia e Eutanásia

Os animais foram anestesiados com administração intramuscular da associação de 50mg/kg cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas São Paulo, Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda. – Osasco, São Paulo, Brasil) e submetidos à cirurgia para exodontia do dente incisivo superior direito seguindo a técnica padronizada por Okamoto e Russo (1973). As bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio cirúrgico estéril e absorvível Vycril 5-0 (poliglactina 910) Ethicon®. As etapas da cirurgia foram apresentadas em sequência de imagens na figura 1. Todos os animais receberam 0,2 mL de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (1,7g/3mL Fort DODGE®) administrado por via intramuscular.

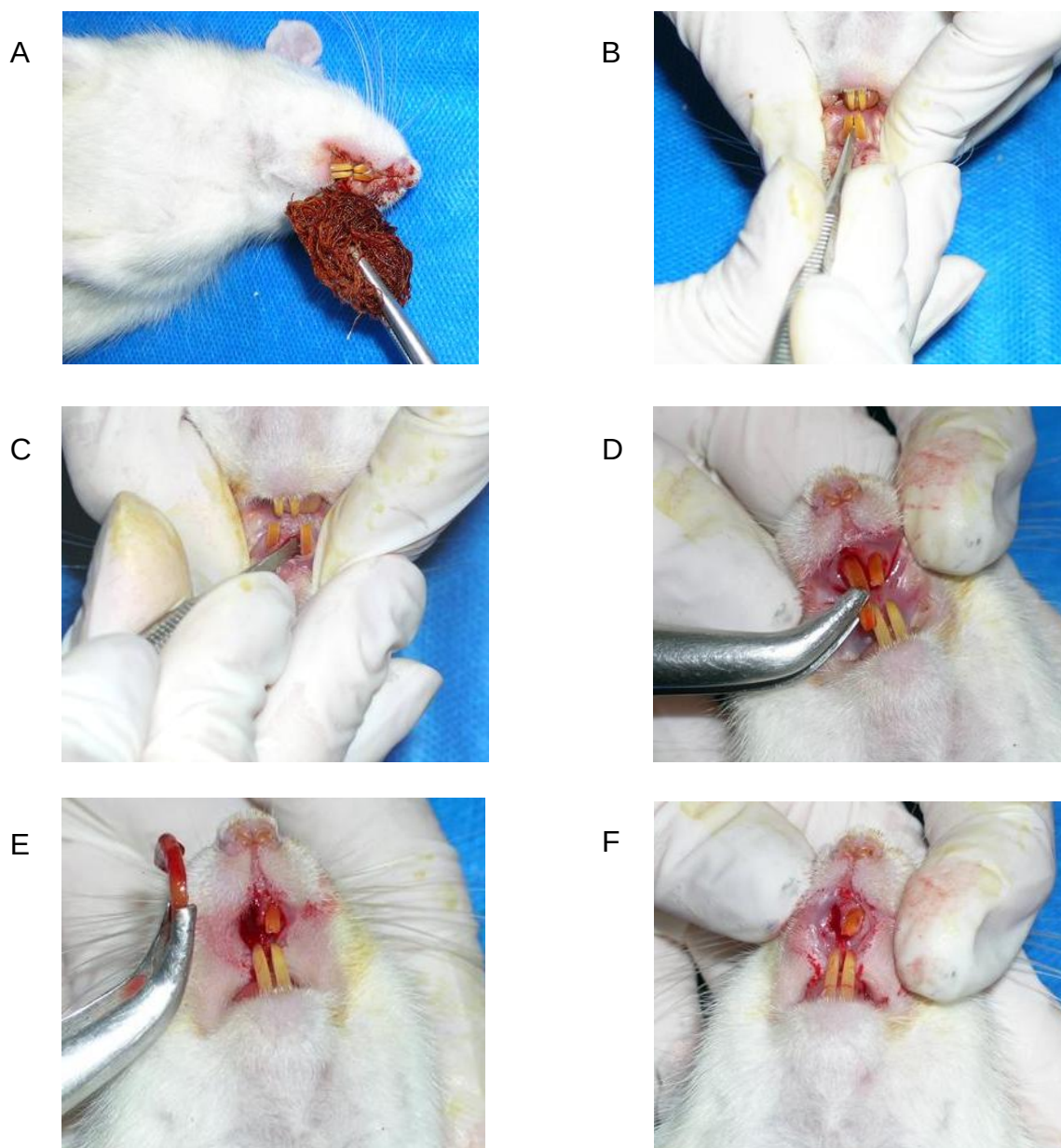


Figura 1- Sequência das etapas da exodontia: A- anti-sepsia, B- posicionamento do instrumento, C -luxação, D e E- exodontia, F- ferida cirúrgica já suturada.

Os ratos foram sacrificados em câmara saturada com halotano nos diferentes dias pós-cirúrgicos. Em seguida, a hemi-maxila direita foi separada da esquerda, por meio da incisão sagital mediana que acompanha a sutura inter-maxilar. Foram obtidas as peças dos alvéolos após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. As peças foram colocadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7, por 24 horas. Após este período, as peças foram limpas para remoção de tecidos moles e radiografadas.

Imagens radiográficas e Análise densitométrica

Para obtenção das imagens radiográficas foi utilizado aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 50 kvp, 10 mA, 10 impulsos (ou 0.166s). A distância foco-filme foi de 40 cm, com incidência perpendicular ao plano filme-objeto. A imagem digital direta foi obtida com a placa óptica do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Sobre cada placa óptica foi colocada uma das peças anatômicas e uma identificação com letras de chumbo. Foi obtida uma imagem de cada peça anatômica dos animais dos diferentes grupos experimentais (Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado). As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em scanner a laser do equipamento Digora e as imagens foram analisadas no software Digora for Windows 1.51 (Fig.2). Este software possibilita, entre outros recursos, a determinação da densidade radiográfica (análise densitométrica), ou seja, a radiopacidade de um determinado objeto, através de seus níveis de cinza.

Para análise, foram selecionadas áreas de tamanho padronizado (medida em pixel – π) para leitura no terço médio do alvéolo (18X46 π). O valor de densidade média foi utilizado para os cálculos necessários. Para o teste estatístico foi utilizada a análise de variância com dois fatores (Anova *two-way*) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey.

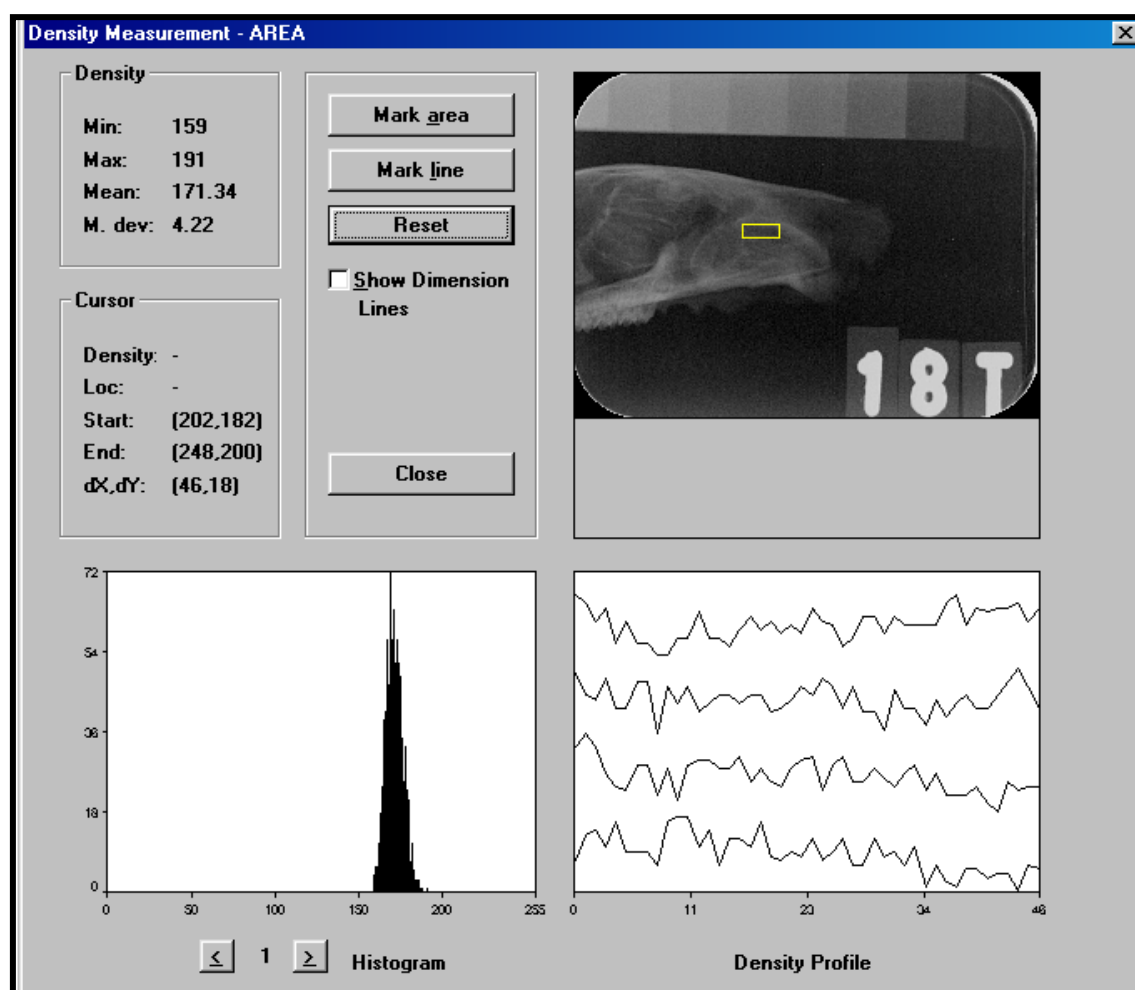


FIGURA 2- Imagem radiográfica do alvéolo dentário indicando a área onde foi analisada a DMO (densidade mineral óssea) no terço médio do alvéolo pelo software Digora.

Processamento histológico

Imediatamente após a radiografia, as peças anatômicas foram novamente imersas em formalina tamponada 10% por mais 24 horas para a fixação dos tecidos. Após este período, foram lavadas em água corrente por 24 horas e então foi iniciada a descalcificação seguindo técnica previamente padronizada.

Para a descalcificação das peças foi utilizada solução de EDTA 4,13% (Preparo da solução de EDTA: em um litro de tampão fosfato, pH 7,2, diluir os solutos EDTA (41,3 g) e NaOH (4,4 g)). As peças foram colocadas individualmente em frascos plásticos com solução de EDTA e mantidos sob refrigeração em geladeira a 4°C. A solução de EDTA foi trocada semanalmente durante todo o período de descalcificação (aproximadamente sete semanas) até que fosse identificada a descalcificação necessária. Esta identificação foi feita por método mecânico simples (penetração, sem resistência, de uma agulha anestésica odontológica na peça anatômica).

Em seguida, as peças descalcificadas passaram pelo processo de diafanização, realizado seguindo a seqüência de álcoois e xilol descrita a seguir: álcool 70% - 1 hora, álcool 80% - 1 hora, álcool 90% - 13 horas, álcool 95% - 1 hora, álcool 100% (primeira etapa) – 1 hora, álcool 100% (segunda etapa) – 1 hora, álcool 100% (terceira etapa) – 1 hora; álcool associado à xilol – 20 minutos; xilol (passo I) – 20 minutos, xilol (passo II) – 20 minutos, e na seqüência foram incluídas em parafina.

Os cortes foram feitos com uma espessura de 5µm com navalhas de aço 18 cm (Leica) e corados em hematoxilina e eosina seguindo metodologia descrita a seguir: Inicialmente foram dissolvidos a hematoxilina (5g) em 50ml de álcool absoluto e 100g de alúmen de potássio em um litro de água destilada quente. Ambas as soluções foram misturadas entre si e, posteriormente, acrescentou-se 2,5g de óxido vermelho de mercúrio até a solução final obter coloração púrpura escura. Depois de preparada, a solução de hematoxilina 0,5% foi rapidamente resfriada e filtrada, estando, assim, própria para o uso. Para o preparo da eosina foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se a hematoxilina por 10g de eosina, obtendo-se, ao final,

uma solução de eosina a 1%. Para a coloração das lâminas com HE (hematoxilina e eosina) realizaram-se as seguintes etapas na seqüência de 1- 20:

- 1- Xilol I por 10 minutos;
- 2- Xilol II por 10 minutos;
- 3- Álcool 100% I por 1 minuto;
- 4- Álcool 100% II por 1 minuto;
- 5- Álcool 100% III por 1 minuto;
- 6- Álcool 95% por 1 minuto;
- 7- Álcool 75% por 1 minuto;
- 8- Água corrente rapidamente;
- 9- Hematoxilina por cerca de 5 minutos;
- 10- Água corrente até clarear;
- 11- Eosina por cerca de 30 segundos;
- 12- Água corrente rapidamente;
- 13- Álcool 95% I rápido;
- 14- Álcool 95% II rápido;
- 15- Álcool 100% I por 30 segundos;
- 16- Álcool 100% II por 30 segundos;
- 17- Álcool 100% III por 30 segundos;
- 18- Xilol I por 5 minutos;
- 19- Xilol II por 5 minutos;
- 20- Montagem da lâmina (1 ou 2 gotas de bálsamo “Permunt” sobre a lâmina e sobreposição da lamínula).

Análise histomorfométrica

Foram obtidos dois cortes de cada hemi-maxila dos animais. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para a análise morfométrica do tecido ósseo em formação no terço médio do alvéolo de ratos Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado. As lâminas foram codificadas e o examinador não conhecia a procedência dos cortes histológicos. Uma área de 897,8 x 1263,7µm foi analisada em cada região histológica do terço médio e examinada por microscopia de luz com objetiva de 20X. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (JVC TK1270 Color Video Câmera) acoplada ao microscópio e analisadas pelo software Leica Qwin Cor / RGB (Figs.3 e 4). O percentual ósseo da área e a espessuras das trabéculas foram medidos e comparados entre os grupos. Foram feitas vinte medidas diferentes das espessuras das trabéculas em cada lâmina. Posteriormente, o valor médio destas medidas foi analisado e comparado entre os grupos. Para o teste estatístico foi utilizada a análise de variância com dois fatores (Anova *two-way*) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey.

Análise Imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário a osteoprotegerina (OPG, Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), a RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627), RANK (Goat anti-rank - Santa Cruz Biotechnology, SC7626), MMP-9 (Goat anti-MMP9 - Santa Cruz Biotechnology, SC6840). Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE).

O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's.

Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo).

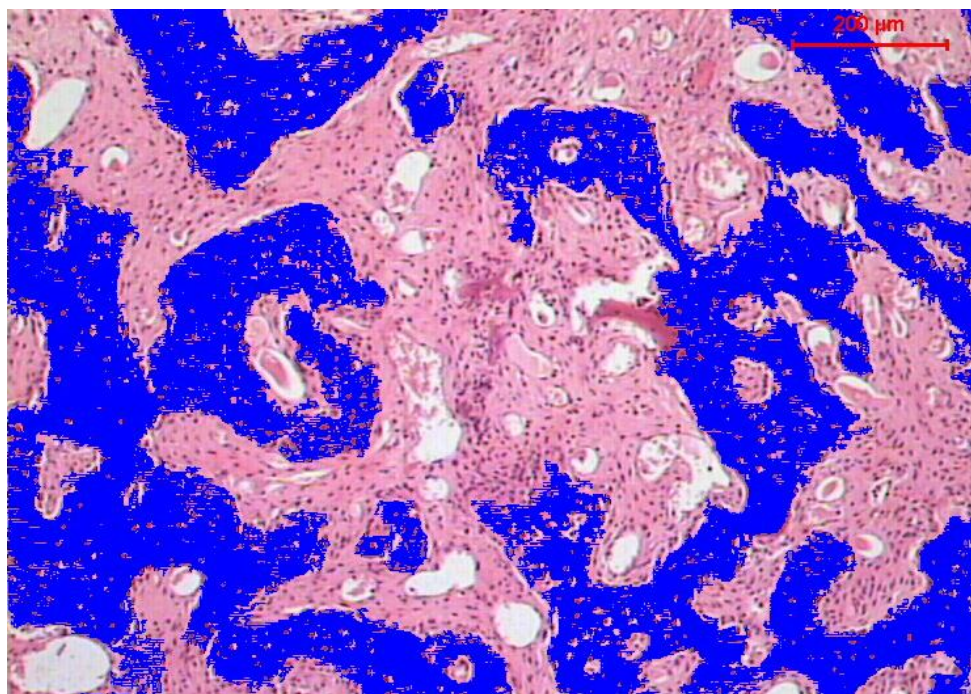


Figura 3- Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de SHR ao 21º dia pós-cirúrgico. Matriz óssea marcada em azul pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)

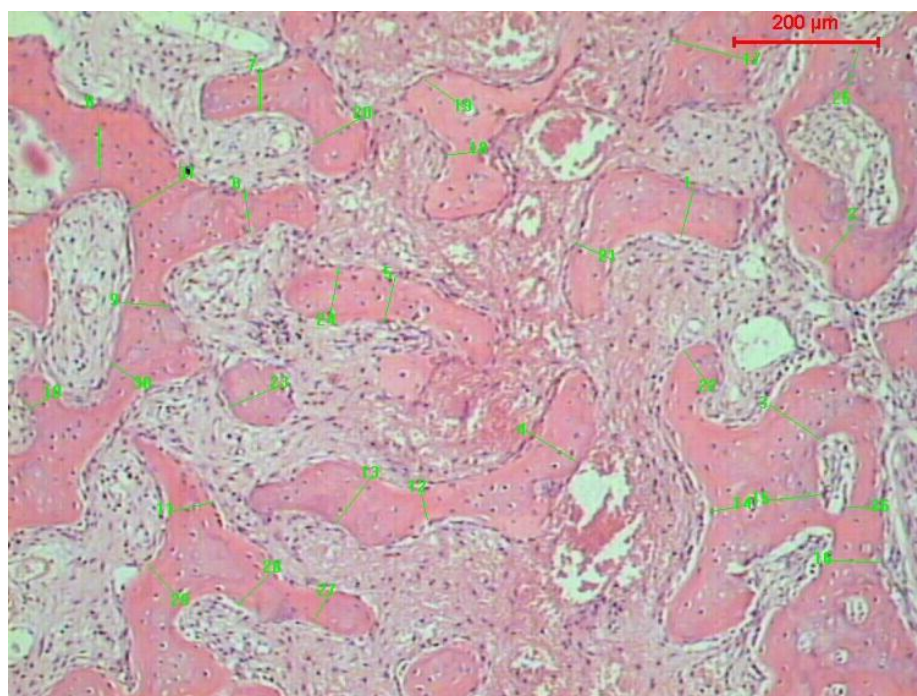


Figura 4. Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de Wistar ao 14º dia pós-cirúrgico. Marcação da espessura das trabéculas em verde pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)

Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% (Perhidrol 30% H₂O₂ - MERCK) por 45 minutos. As secções sofreram recuperação antigênica por tampão citrato (pH 6,0 – 55°C) e posteriormente foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas a serem analisadas e em concentrações previamente testadas e padronizadas. Após 18h as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos) e incubados com um segundo anticorpo biotinilado, por mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo StreptAvidina-biotina (Strept ABComplex/HRP-Dako) por 45min.

O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente, atribuindo-se os *scores* 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os *scores* foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado. As lâminas foram codificadas e o examinador desconhecia a procedência dos cortes histológicos.

Os resultados foram expressos pela mediana e analisados por teste (não paramétricos) de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn para avaliar os períodos dentro de cada grupo e teste de Mann Whytney para comparação entre os grupos em cada período específico, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A PAS foi aferida antes da cirurgia e nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 42 dias pós-cirúrgicos. A PAS de SHR foi maior ($p<0,05$) que a de Wistar em todos os períodos analisados. A partir do início do tratamento com atenolol, foi observada importante redução da PAS em SHR que se manteve durante todo o período de tratamento, assim SHR tratados com atenolol apresentaram PAS menor ($p<0,05$) que de SHR não tratados em todos os períodos analisados. O tratamento com atenolol não alterou a PAS de ratos normotensos Wistar (Fig. 5).

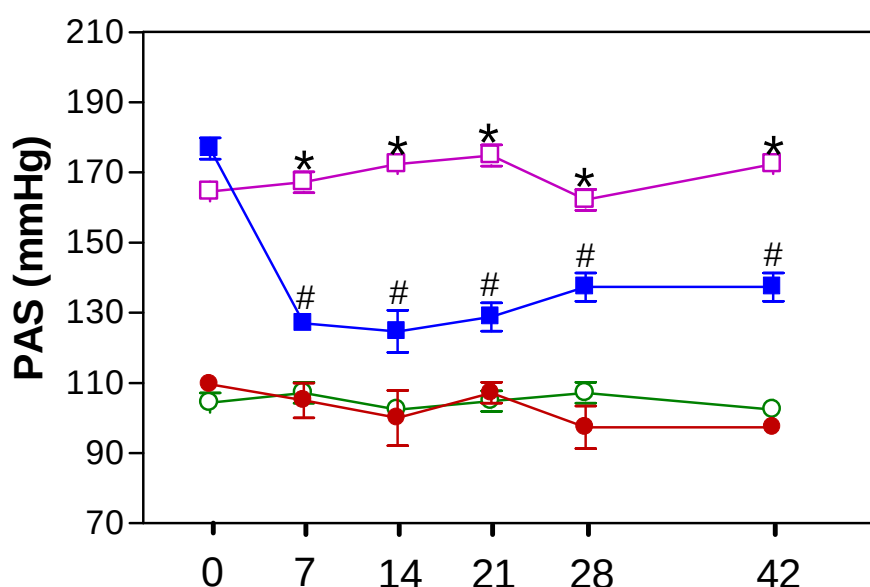


FIGURA 5- PAS de ratos Wistar (círculos abertos), Wistar tratado com atenolol (círculos fechados), SHR (quadrados abertos) e SHR tratado com atenolol (quadrado fechado). Os pontos representam a média $\pm$ EPM dos experimentos realizados ($n=5$). * $p<0,05$ entre SHR e outros grupos. # $p<0.05$ entre SHR tratados e outros grupos (Anova).

Estudo comparativo do processo de reparo alveolar entre ratos normotensos Wistar e hipertensos SHR

Análise Densitométrica

A Densidade Mineral Óssea (DMO) média foi avaliada no terço médio dos alvéolos de ratos Wistar e SHR, nos diferentes tempos pós-cirúrgicos. Na tabela 1, os valores de DMO máxima, média e mínima do terço médio foram demonstrados e comparados entre os grupos. Nos gráficos, apresentados abaixo, apenas os valores obtidos de DMO média no terço médio foram comparados entre os grupos.

No terço médio do alvéolo de ratos Wistar (Tab.1, Fig. 6) não foram observadas diferenças entre os valores de DMO média e máxima entre os 7º, 14º, 21º e 42º dias de reparo alveolar, no entanto foi observado aumento da DMO média e máxima no 28º quando comparado aos 7º e 14º dias pós-cirúrgicos. Não houve diferença entre os valores de DMO mínima nos períodos analisados. Os dados demonstraram que a formação óssea no terço médio pode ser detectada pelo aumento dos valores de DMO média ao 28º dia de reparo alveolar em ratos Wistar.

No terço médio do alvéolo de SHR, não foram detectados aumentos entre os valores de DMO média, máxima ou mínima nos dias analisados, no entanto, os menores valores de DMO média e mínima foram observados ao 28º dia quando comparados aos outros dias pós-cirúrgicos (Tab. 1, Fig. 6).

Quando comparados os grupos (Tab.1, Fig. 6), foi observado que os valores de DMO máxima aos 14º, 21º e 42º dias estariam aumentados no terço médio de alvéolos de SHR quando comparados aos de Wistar. No entanto, estes valores aumentados de DMO máxima não foram suficientes para alterarem a DMO média, sendo que os valores de DMO média dos referidos períodos em alvéolos de SHR não foram diferentes dos observados em alvéolos de Wistar. Ao comparar os grupos também foi observado que ao 28º dia, os valores de DMO média e mínima eram menores no terço médio de alvéolos de SHR.

Tabela 1- Densidade mineral óssea do terço médio de ratos Wistar e SHR.

DIAS	DMO MÉDIA		DMO MÍNIMA		DMO MÁXIMA	
	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR
7	159,0±0,9bA	164,0±4,9abA	146,4±1,4aA	153,2±5,4abA	176,4±2,1bA	180,4±4,1aA
14	160,2±4,4bA	166,1±2,5abA	146,2±4,9aA	149,6±3,7abA	175,4±2,9bB	182,6±1,1aA
21	164,6±1,3abA	171,2±0,8aA	151,0±1,5aA	155,0±1,2aA	180,0±1,9abB	188,2±1,2aA
28	171,3±1,5aB	159,4±1,8bA	155,6±1,5aA	142,4±2,2bB	187,0±2,6aA	181,6±1,4aA
42	163,4±1,3abA	170,6±2,7aA	148,0±1,4aA	152,2±2,8abA	181,2±1,8abB	189,6±2,4aA

Médias ± EPM seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

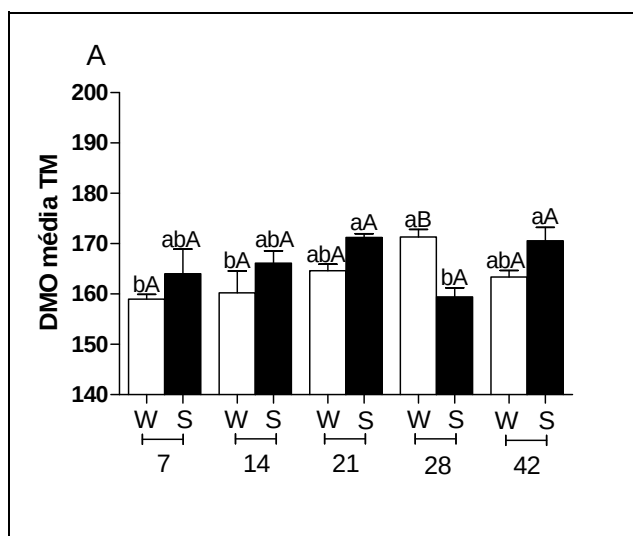


FIGURA 6- Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S). As barras representam a média ± EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Diferente do observado em alvéolos de ratos Wistar, não foi possível detectar pela análise radiográfica, aumentos significativos de formação óssea nos alvéolos de SHR, sendo observada nesse grupo menor DMO ao 28º dia quando comparada aos períodos de 21 e 42 dias. Estes resultados demonstram que alterações importantes na formação de tecidos mineralizados em alvéolos de SHR podem ser detectadas por esta metodologia.

Análise Histológica qualitativa

Pela análise histológica qualitativa (objetiva de 16X), as diferenças histológicas no terço médio dos alvéolos foram correlacionadas aos diferentes períodos avaliados e ao grupo experimental.

7 DIAS

Em alvéolos de ratos Wistar, foi observado que o terço médio encontrava-se ocupado por trabéculas ósseas neoformadas, em alguns pontos espessas e, em outros, delgadas (Fig. 7A).

No terço médio de alvéolos de ratos SHR, foi observada a presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas com osteoblastos em suas bordas (Fig. 7F). O tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, exibiu moderado número de fibroblastos e alguns macrófagos e linfócitos.

14 DIAS

Nos terços médio dos alvéolos de ratos Wistar, foi notada presença de trabéculas ósseas discretamente mais organizadas, ocupando regularmente o espaço avaliado (Fig. 7B). O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentou moderado número de fibroblastos.

Em alvéolos de SHR, foi evidenciada a presença de trabéculas ósseas, geralmente pouco organizadas (Fig. 7G) preenchendo o espaço considerado (terço médio). O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentou moderado número de fibroblastos.

Os dados mostraram que, pela análise histológica, neste período já é possível verificar pequenas diferenças na organização das trabéculas (pouco organizadas) presentes no terço médio de alvéolos de SHR.

21 DIAS

No terço médio de alvéolos de ratos Wistar, foi evidenciado tecido ósseo neoformado bem desenvolvido, ocupando regularmente todo o espaço analisado (Fig. 7C).

Em alvéolos de SHR, ao nível do terço médio, as trabéculas ósseas estavam bem desenvolvidas, mostrando-se mais regulares (Fig. 7H). No entanto, foram

observadas inúmeras áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea exibindo moderado número de fibroblastos.

Ao 21º dia, apesar da presença de trabéculas ósseas bem desenvolvidas, a presença de muitas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e fibroblastos no terço médio de SHR, sugere um atraso do reparo em relação aos ratos Wistar.

28 DIAS

Em Wistar, o alvéolo dental encontra-se totalmente preenchido por trabéculas ósseas bem diferenciadas (Fig.7D), as quais estariam relacionadas aos valores aumentados de DMO média, que foram observados especificamente neste período na análise densitométrica.

No terço médio alveolar de SHR, foi observada a presença de trabéculas ósseas espessas e bem regulares (Fig. 7I). Em alguns pontos, no entanto, áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea podiam ser ainda observadas.

Ao 28º dia, a persistência do tecido conjuntivo sem diferenciação óssea em áreas do terço médio de alvéolos de SHR, estaria correlacionada com os menores valores de DMO detectados pela análise densitométrica e corrobora a sugestão de atraso no reparo alveolar nestes animais em relação aos ratos Wistar.

42 DIAS

Em todos os animais do grupo Wistar, notou-se ao longo de toda extensão do alvéolo dental, a presença de tecido ósseo neoformado totalmente diferenciado (Fig. 7E), condição tecidual muito próxima àquela observada ao 28º dia. Os valores de DMO observados neste período não foram diferentes dos observados ao 28º dia.

Em todos os espécimes de SHR, ao longo de toda extensão do alvéolo dental, observou-se presença de tecido ósseo totalmente diferenciado (Fig. 7J).

No 42º dia, não houve diferenças histológicas no reparo alveolar entre SHR e Wistar, o que também não foi detectado pela análise radiográfica.

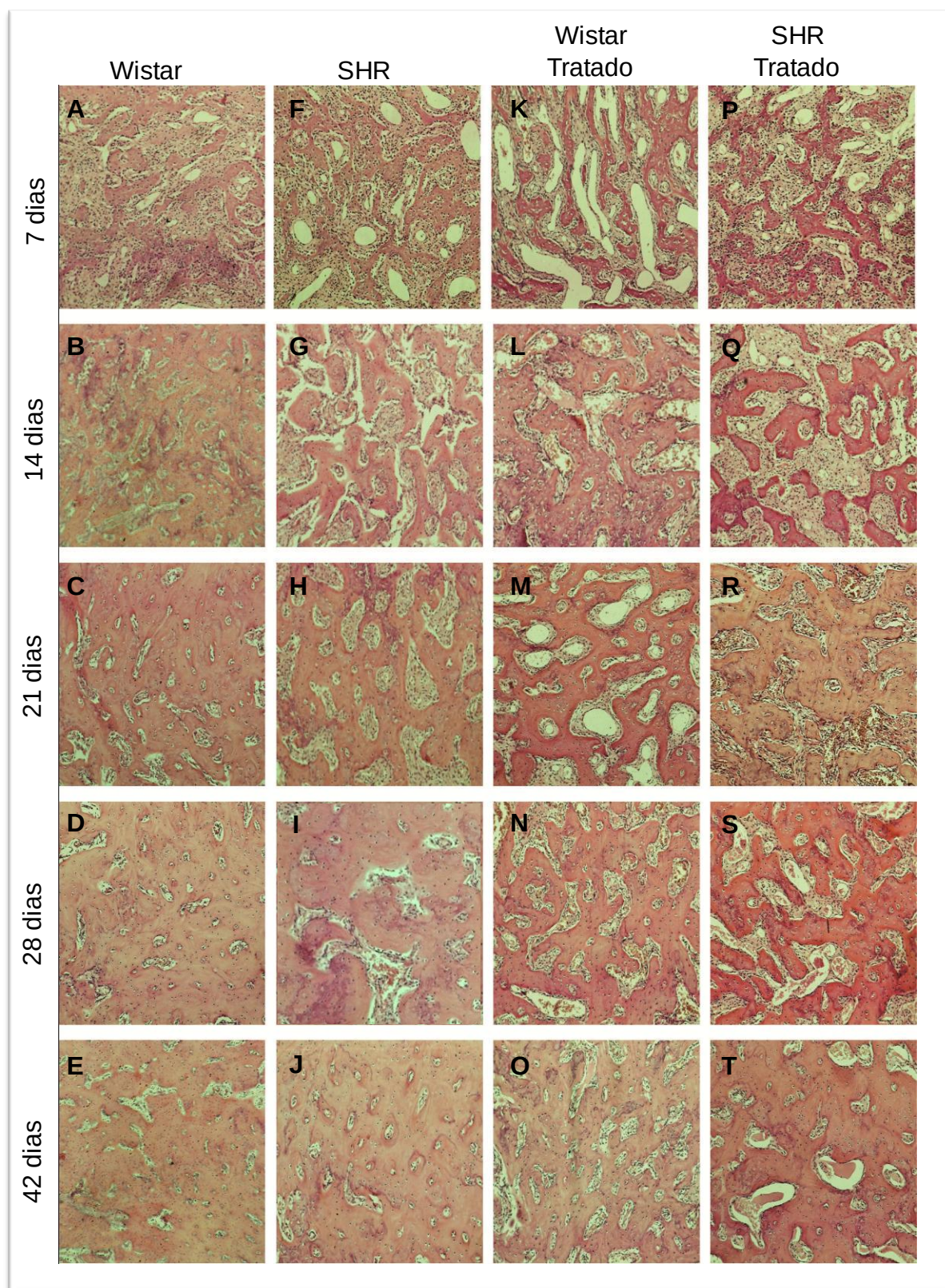


Figura 7. Imagens histológicas do terço médio do alvéolo em ratos. (Objetiva de 16X)

Análise histomorfométrica do terço médio do alvéolo

Percentual de tecido ósseo em Wistar e SHR

Para avaliarmos se as possíveis diferenças qualitativas detectadas pelas análises histológicas poderiam ser quantitativamente medidas, procedemos à análise histomorfométrica do terço médio alveolar de ambos os grupos. Inicialmente, relacionamos o percentual ósseo com o dia de reparo e comparamos estes valores entre os grupos de animais.

Quando analisado o percentual ósseo no terço médio de alvéolos de ratos Wistar foi observado um aumento deste percentual aos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparado com o 7º dia pós-cirúrgico. Aos 28º e 42º dias foi observado um aumento quando comparado ao 14º dia, e ainda um aumento no 42º dia quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico. (Tab.2; Fig.8), demonstrando aumento progressivo de formação óssea até o 42º dia pós-cirúrgico.

O percentual ósseo em SHR expressou aumento nos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico, expressou aumento também nos 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico. (Tab.2; Fig.8). Entre os dias 21, 28 e 42 não houve diferença entre os valores obtidos, demonstrando que o processo de reparo alveolar não apresenta a mesma progressão de formação óssea que observada alvéolos de ratos Wistar.

Quando comparados os valores obtidos entre os grupos Wistar e SHR, foi observado um reduzido percentual ósseo em SHR aos 14º, 28º e 42º dias (Tab.2; Fig.8). Os valores reduzidos de percentual ósseo estariam correlacionados com menores áreas de tecido ósseo formado, uma vez que foram observadas ao 21º e 28º dias, áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea em alvéolos de ratos SHR.

Tabela 2- Percentual de tecido ósseo em ratos Wistar e SHR

% TECIDO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR	SHR
7	10,13±1,47dA	4,65±1,43cA
14	31,16±4,26cA	20,53±2,42bB
21	40,28±3,18bcA	38,88±2,70aA
28	49,34±2,08abA	35,66±3,79aB
42	57,25±2,15aA	46,10±1,36aB

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

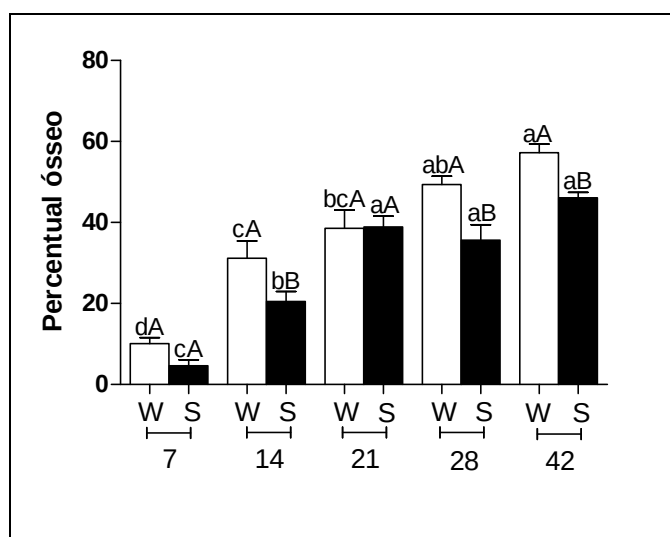


FIGURA 8- Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S). As barras representam média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Espessuras das trabéculas ósseas

Quando analisado o trabeculado ósseo em ratos Wistar foi observado aumento da espessura das trabéculas ósseas ao longo dos períodos analisados, sendo constatado aumento significativo aos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico, observando também este aumento ao 42º dia

pós-cirúrgico quando comparado aos 14º, 21º e 28º dias pós-cirúrgicos. Não houve diferença nas espessuras das trabéculas entre os 14º, 21º e 28º dias (Tab.3; Fig.9). Estes dados demonstram que a espessura das trabéculas ósseas aumenta progressivamente com a evolução do processo de reparo alveolar em ratos Wistar, assim como observado no percentual de tecido ósseo.

Em SHR, foi observado aumento do trabeculado ósseo aos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico. Foi observado também esse aumento nos 21º, 28º e 42º dias pós-cirúrgicos quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico. No 42º dia pós-cirúrgico foi observado um aumento da espessura das trabéculas ósseas quando comparado aos 21º e 28º dias pós-cirúrgicos (Tab.3; Fig.9), sugerindo progresso no aumento da espessura das trabéculas até o 42º dia pós-cirúrgico.

Quando comparados os valores das espessuras do trabeculado ósseo formado nos alvéolos de ambos os grupos, foi observado que as espessuras das trabéculas em alvéolos de SHR aos 7º e 42º dias pós-cirúrgicos eram menores do que em alvéolos de ratos Wistar (Tab.3; Fig.9), embora a mesma espessura das trabéculas fosse observada nos outros períodos.

Tabela 3- Espessura do trabeculado ósseo em ratos Wistar e SHR.

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO (μm)		
DIAS	WISTAR	SHR
7	41,30 $\pm$ 1,83cA	29,09 $\pm$ 1,51dB
14	65,42 $\pm$ 5,97bA	56,60 $\pm$ 1,86cA
21	77,71 $\pm$ 4,61bA	80,20 $\pm$ 2,35bA
28	72,34 $\pm$ 4,45bA	75,22 $\pm$ 2,46bA
42	111,87 $\pm$ 4,49aA	99,18 $\pm$ 3,43aB

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

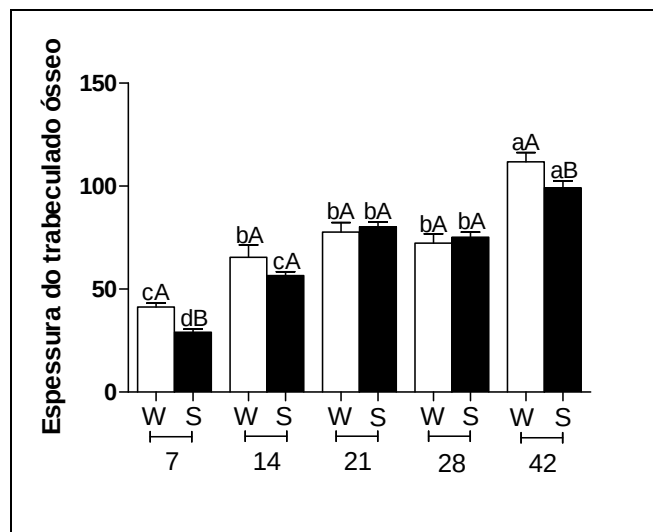


FIGURA 9- Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e SHR (S). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados demonstraram que a progressão do processo de reparo alveolar em SHR não ocorre da mesma maneira que em ratos normotensos Wistar. Em conjunto, os dados revelaram que o processo de reparo alveolar em SHR está atrasado em relação ao observado em ratos normotensos. Pelas análises realizadas, este atraso foi percebido ao final do processo, mais especificamente aos 28º e 42º dias onde os menores valores de DMO média, percentual ósseo e espessura de trabéculas foram detectados.

Para avaliarmos um dos possíveis mecanismos envolvidos neste atraso, a expressão de diferentes proteínas foi estudada nos tecidos neoformados dos alvéolos de ratos Wistar e SHR.

Avaliação da expressão das proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9 em alvéolos de ratos Wistar e SHR.

Conforme descrito anteriormente, a imunomarcação foi analisada por um único observador, previamente calibrado, a partir da atribuição de *scores* de 0 a 3 (*score* 0: sem marcação, 1: marcação fraca/difusa, 2: marcação moderada e 3: marcação intensa). Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos contra as

proteínas OPG, RANK, RANKL e MMP9, analisadas durante o processo de reparo alveolar aos 7º, 14º, 21º, 28º e 42º dias pós-cirúrgicos. As análises foram realizadas em áreas do terço médio do alvéolo.

Na figura 10, o padrão de marcação para OPG é referente à área onde se observa a coloração castanha. A referida proteína, por ser solúvel (UDAGAWA et al., 2000), apresenta maior marcação nos períodos onde há maior número de células da linhagem mesenquimal. Foi observada marcação em osteoblastos, localizados na periferia das trabéculas ósseas neoformadas e em células de revestimento (Fig.10N,R). Os osteócitos, localizados no interior do trabeculado ósseo, também foram evidenciados (Fig.10F). Avaliando a atribuição de escores para OPG em alvéolos de ratos Wistar, foi verificado um padrão de marcação moderada que não se alterou entre os 7º e 21º dias pós-cirúrgicos. Pode ser verificado que nesses períodos houve marcação no tecido conjuntivo e em células do tecido ósseo. Ao 28º dia a marcação foi considerada fraca, voltando a ser moderada ao 42º dia (Tab.4; Figs 10A-E, 14). A redução na marcação ao 28º dia (de moderada para fraca) estaria correlacionada a substituição do tecido conjuntivo pelo tecido ósseo e a marcação apenas em células de linhagem osteoblástica no tecido ósseo neoformado.

Em alvéolos de SHR, a marcação fraca foi observada dos 7º ao 28º dias, havendo marcação moderada para OPG somente ao 42º dia (Tab.4; Figs. 10F-J,14).

Comparando os valores de scores atribuídos, observamos que a marcação para OPG não apresentou diferença significativa nos períodos analisados dentro do grupo. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na expressão de OPG entre os grupos Wistar e SHR, apesar do gráfico mostrar uma marcação mais intensa até o 21º dia do processo de reparo no grupo Wistar (Tab.4; Figs.10A-J, 14).

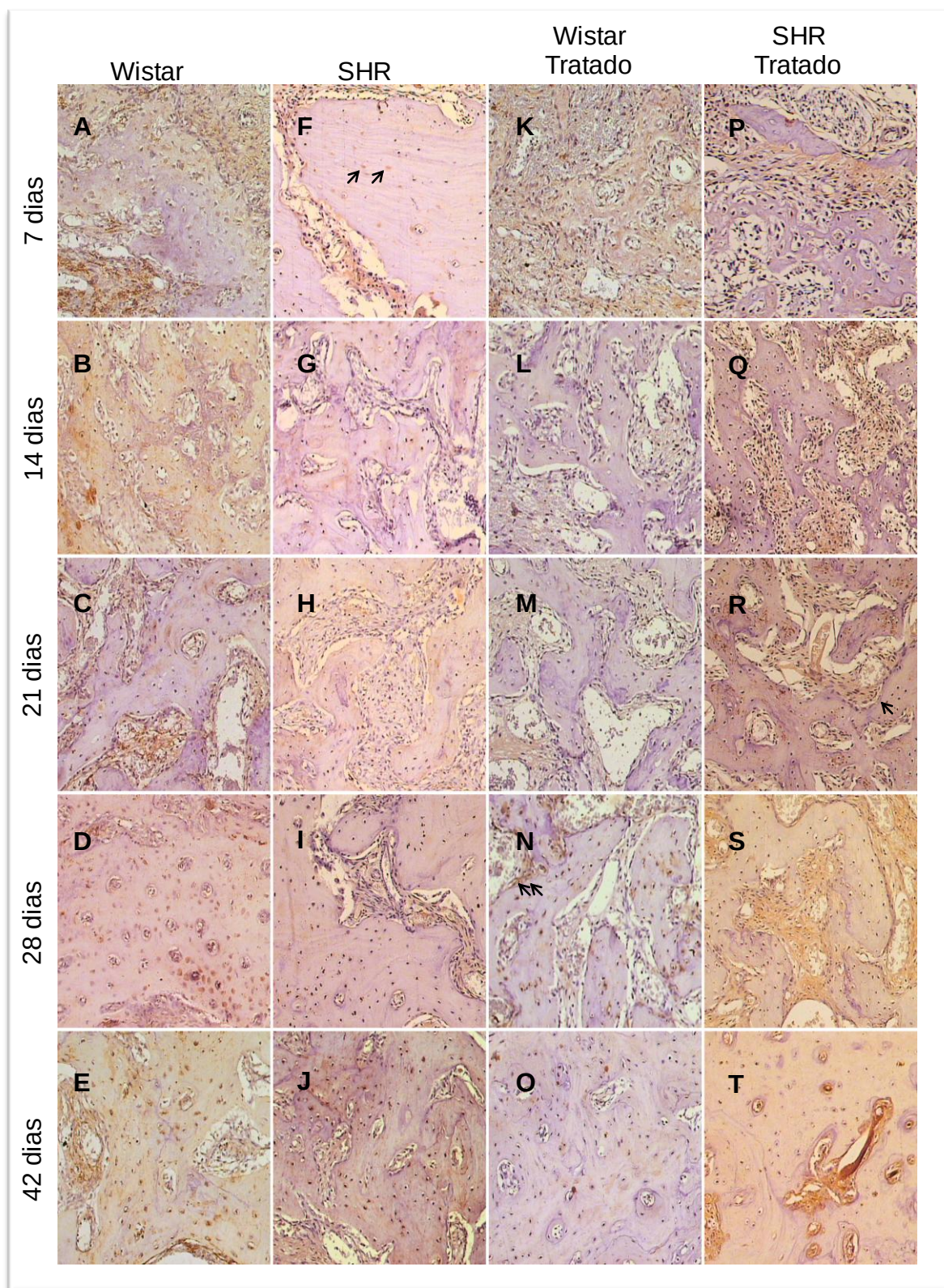


FIGURA 10- Imagens histológicas das reações contra a proteína OPG no terço médio do alvéolo em ratos. (Objetiva de 20X).

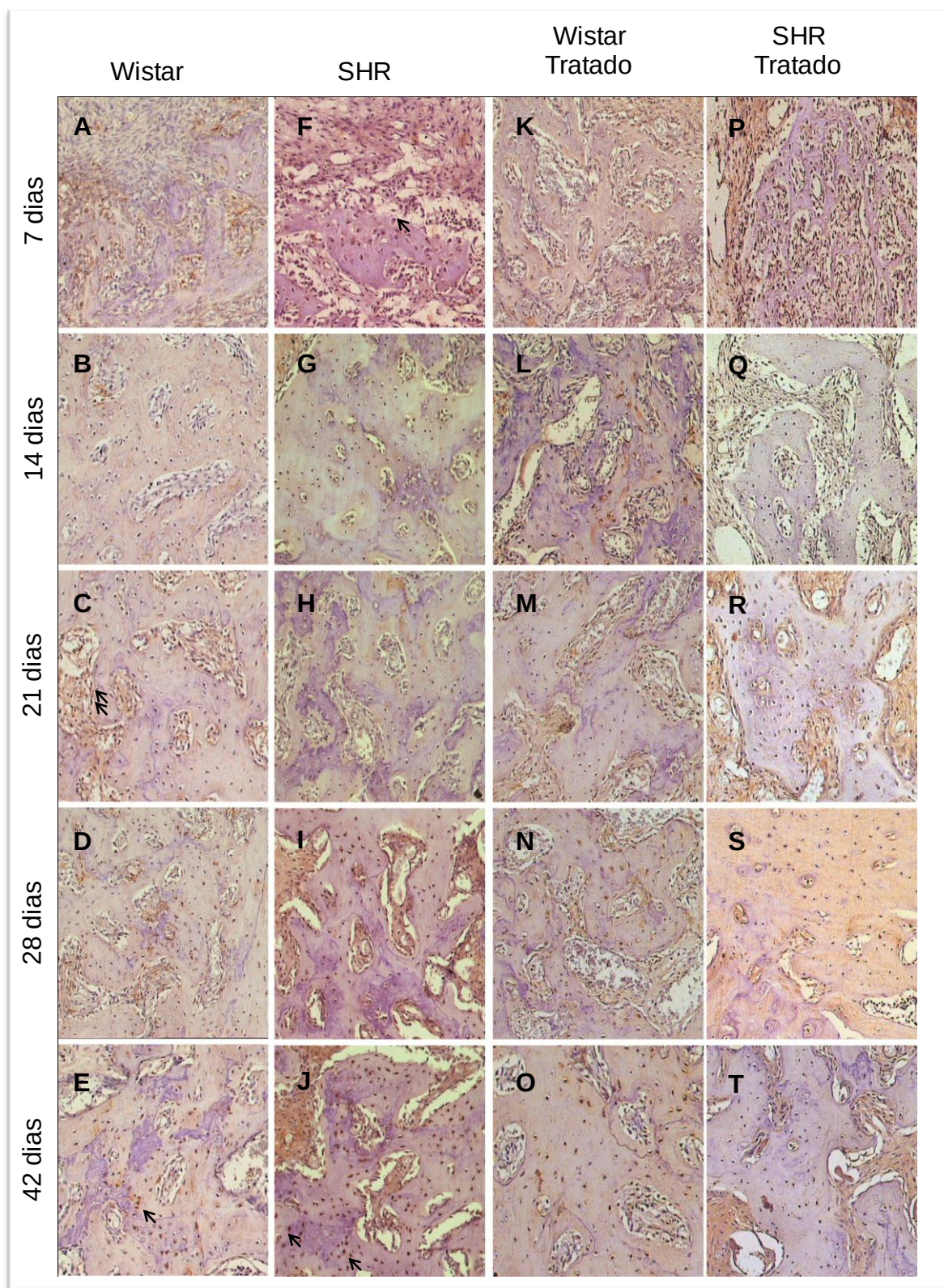


FIGURA 11- Imagens histológicas das reações contra a proteína RANKL no terço médio do alvéolo em ratos. (Objetiva de 20X).

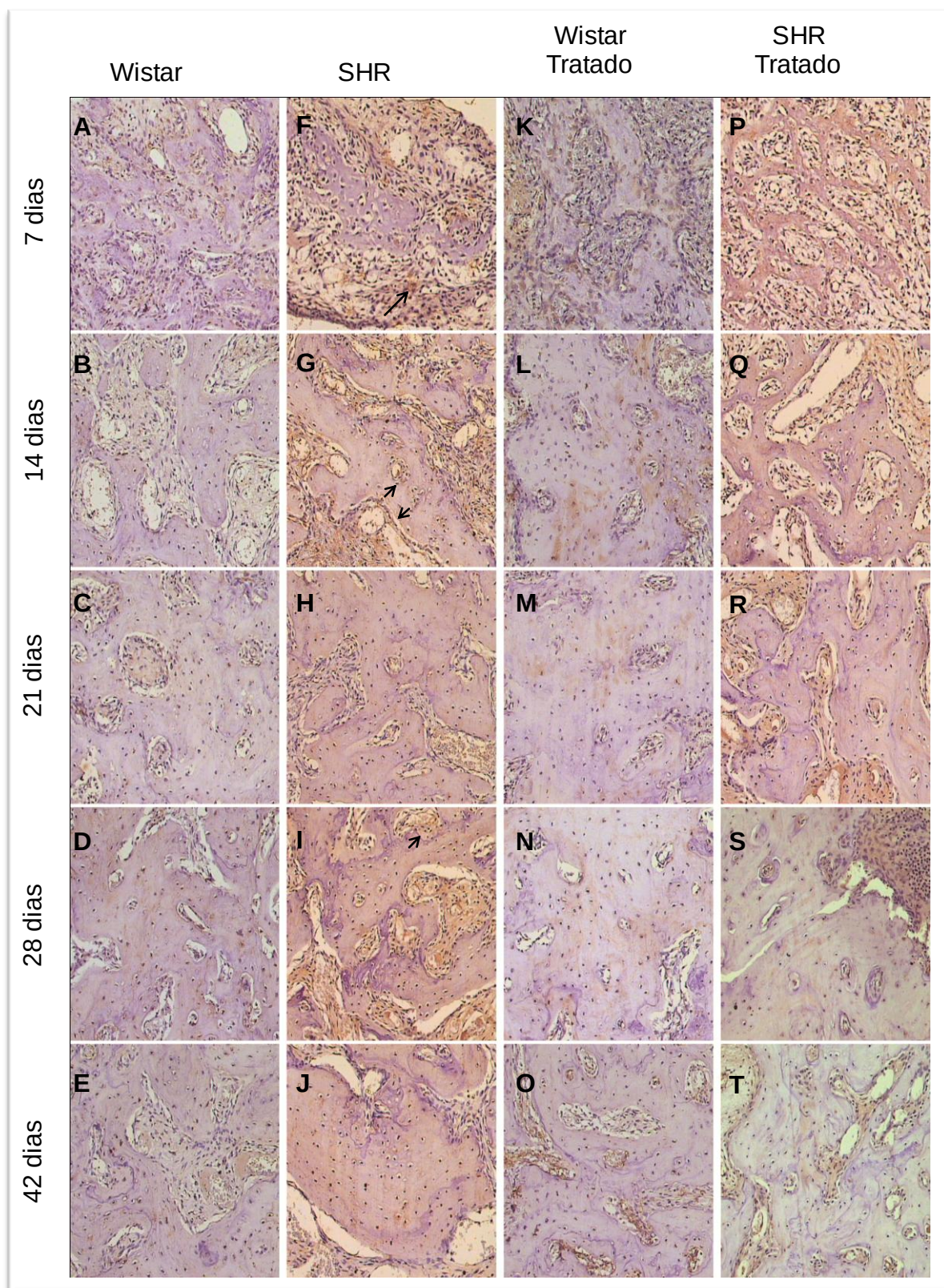


FIGURA 12- Imagens histológicas das reações contra a proteína RANK no terço médio do alvéolo em ratos. (Objetiva de 20X).

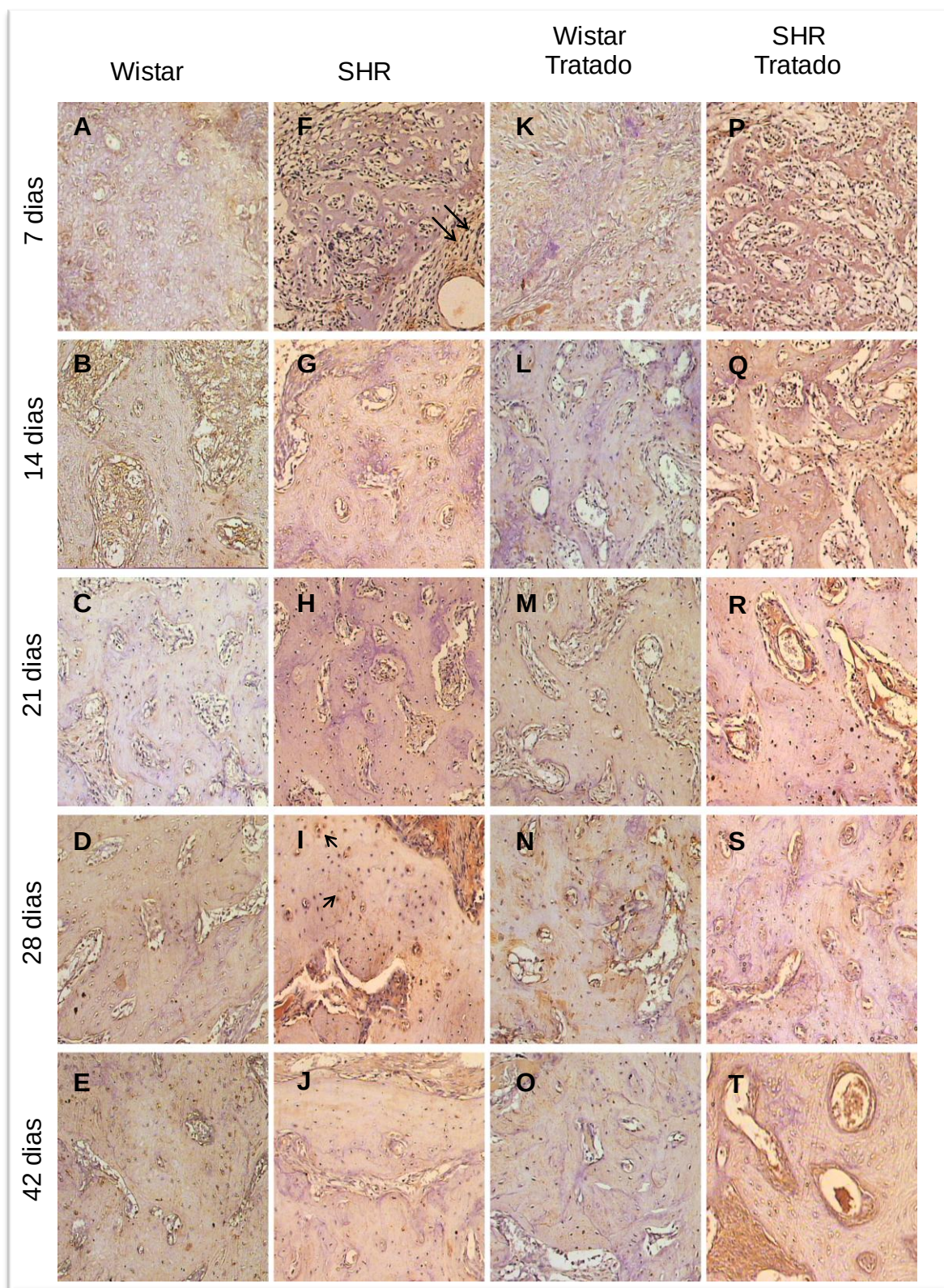


FIGURA 13- Imagens histológicas das reações contra a proteína MMP-9 no terço médio do alvéolo em ratos.(Objetiva de 20X).

Tabela 4- Expressão da proteína OPG em ratos Wistar e SHR

OPG		
DIAS	WISTAR	SHR
7	2 aA	1 aA
14	2 aA	1 aA
21	2 aA	1 aA
28	1 aA	1 aA
42	2 aA	2 aA

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

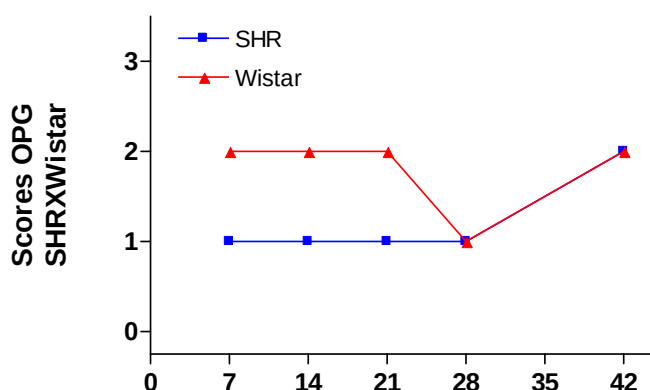


FIGURA 14- Gráfico da análise da imunomarcação para OPG durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR. Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos.

Nas reações realizadas para a evidenciação da proteína RANKL (Fig.11), observamos marcações específicas em osteoblastos (Fig.11F). Células de revestimento (Fig.11C) e osteócitos (Fig.11E,J) também apresentaram marcação positiva para essa proteína.

Dentro do grupo Wistar não houve diferença na expressão de RANKL entre os períodos analisados (Tab.5 ;Fig. 11A-E, 15). No grupo SHR, o 28º dia apresentou maior expressão ($p < 0.05$) de RANKL nas células de linhagem osteoblástica quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico (Tab.5; Fig.11H, I, 15).

A marcação para RANKL foi significativamente mais intensa ao 28º dia pós-cirúrgico em SHR quando comparado ao Wistar (Tab.5 ;Fig.11D, I, 15).

Tabela 5- Expressão da proteína RANKL em ratos Wistar e SHR

RANKL		
DIAS	WISTAR	SHR
7	1 aA	1 abA
14	1 aA	1 abA
21	1 aA	1 aA
28	1 aA	3 bB
42	1 aA	1 abA

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

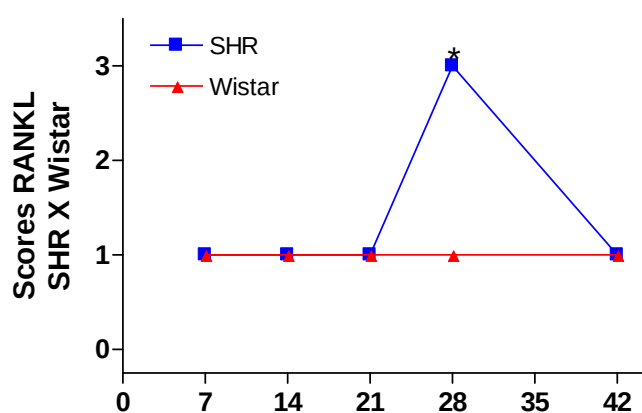


FIGURA 15- Gráfico da análise da imunomarcagem para RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR. Os pontos representam a mediana dos scores atribuídos. * Mann Whitney, $p < 0,05$.

Avaliando a correlação entre as marcações específicas para OPG e RANKL dentro dos grupos nos diferentes períodos, observamos que ao 28º dia houve maior expressão de RANKL do que de OPG em alvéolos de SHR (Fig.16).

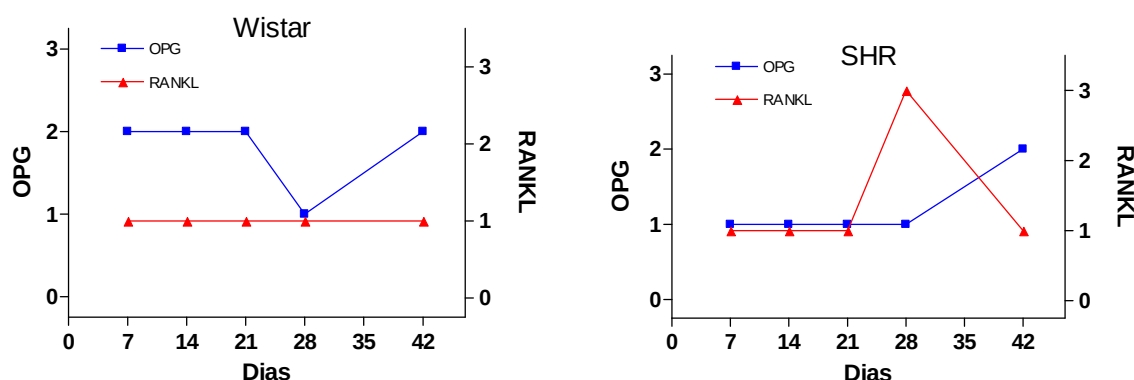


FIGURA 16- Gráficos da análise da imunomarcção para OPG e RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR. Os pontos representam a mediana dos scores atribuídos.

Ao analisarmos as marcações contra a proteína RANK (Fig.12), os resultados mostram a imunomarcção de células com morfologia semelhante a osteoblastos (Fig.12F,I). Foi observada também, a imunomarcção para RANK nas células de revestimento do tecido ósseo (Fig.12G). As células marcadas positivamente, apresentam morfologia semelhante a osteoblastos, que pela ausência de atividade metabólica, adquirem forma alongada e desempenham papel de revestimento do tecido ósseo. Através de análise estatística dos *scores*, pudemos observar que não houve alteração da expressão nos diferentes períodos em alvéolos de ratos Wistar (Tab.6; Figs.12A-E, 17), mas em SHR, no 14º dia houve maior expressão que ao 21º dia pós-cirúrgico e ao 28º dia houve maior expressão de RANK que ao 21º dia pós-cirúrgico (Tab.6; Figs.12G-I, 17).

A RANK apresentou marcação significativamente mais intensa em alvéolos de SHR aos 14º e 28º dias quando comparado ao Wistar (Tab.6; Figs.12B, G, D, I; 17).

Tabela 6- Expressão da proteína RANK em ratos Wistar e SHR

RANK		
DIAS	WISTAR	SHR
7	1 aA	1 abA
14	0 aA	2 aB
21	1 aA	1 bA
28	1 aA	2 aB
42	1 aA	1 abA

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

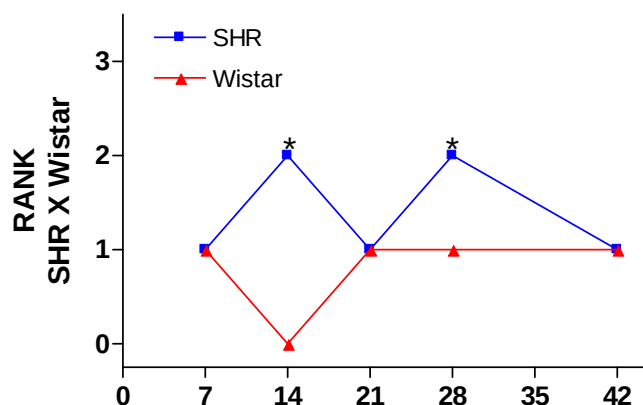


FIGURA 17- Gráfico da análise da imunomarcação para RANK durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR. Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos. * Mann Whitney, $p < 0,05$.

Nas reações realizadas para a identificação da MMP-9 (Fig.13), observamos marcações em células de linhagem mesenquimal (Figs.13I,F), sendo bastante observada essa marcação na matriz extracelular (onde há presença de colágeno) nas trabéculas ósseas, assim como no tecido conjuntivo ao seu redor.

Não houve diferença significativa na marcação de MMP-9 nos períodos analisados no grupo Wistar (Tab.7; Figs.13A-E, 18), porém, em SHR ao 28º dia a marcação para MMP-9 foi mais intensa do que ao 42º dia pós-cirúrgico (Tab.7; Figs.13I,J,18). Ao 28º dia, foi observada ainda, marcação de MMP-9

significativamente maior em alvéolos de SHR, que em alvéolos de ratos Wistar (Tab.7; Figs.13D,I, 18).

Tabela 7- Expressão da proteína MMP-9 em ratos Wistar e SHR

MMP9		
DIAS	WISTAR	SHR
7	1 aA	3 abA
14	1 aA	2 abA
21	1 aA	1 abA
28	2 aA	2 aB
42	1 aA	1 bA

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

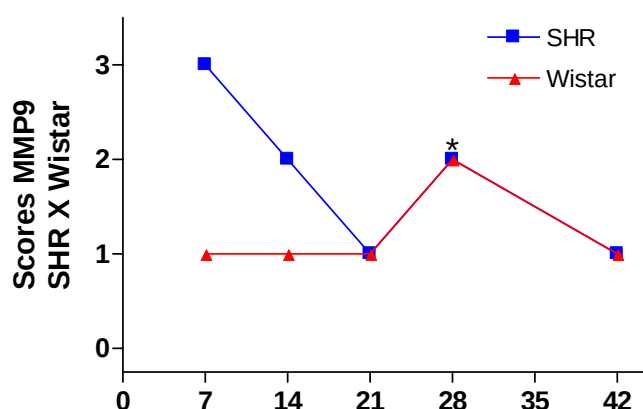


FIGURA 18- Gráfico da análise da imunomarcagem para MMP-9 durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e SHR. Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos. *Mann Whitney $p < 0,05$.

Ao analisar o gráfico, nenhuma diferença entre as medianas relativas ao 28º dia representadas no gráfico é observada. No entanto, a aplicação do teste estatístico demonstra diferença significativa, uma vez que os escores atribuídos para expressão da MMP-9 ao 28º dia em alvéolos de Wistar foram 2, 2, 2, 1, 1 e em alvéolos de SHR foram 2, 2, 2, 3, 3.

Estudo do efeito do atenolol sobre o processo de reparo alveolar em ratos normotensos Wistar e hipertensos SHR.

Análise densitométrica

Os valores de DMO do reparo alveolar dos ratos Wistar tratados com atenolol foram comparados com os valores de DMO do reparo alveolar de ratos Wistar, descritos anteriormente.

No terço médio do alvéolo de ratos Wistar tratados com atenolol (Tab.8, Fig.19) foi observado aumento da DMO média e máxima aos 28º e 42º dias e DMO mínima ao 28º dia quando comparadas ao 14º dia pós-cirúrgico. Nenhuma diferença estatística foi observada quando comparados os grupos Wistar e Wistar tratado com atenolol, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 8- Densidade mineral óssea do terço médio de ratos Wistar e Wistar + atenolol

DIAS	DMO MÉDIA		DMO MÍNIMA		DMO MÁXIMA	
	WISTAR	WISTAR+ ATENOLOL	WISTAR	WISTAR+ ATENOLOL	WISTAR	WISTAR+ ATENOLOL
7	159,0±0,9bA	163,4±2,2abA	146,4±1,4aA	150,8±2,6abA	176,4±2,1abA	177,4±2,7abA
14	160,2±4,4bA	155,1±3,2bA	146,2±4,9aA	141,2±3,8bA	169,6±2,9bA	170,4±2,8bA
21	164,6±1,3abA	160,7±0,9abA	151,0±1,5aA	144,8±1,2abA	180,0±1,9abA	180,0±1,5abA
28	171,3±1,5aA	167,3±4,2aA	155,6±1,5aA	153,2±4,8aA	187,0±2,6aA	186,2±3,7aA
42	163,4±1,3abA	166,1±1,7aA	148,0±1,4aA	149,0±1,9abA	181,2±1,8abA	184,4±1,6aA

Médias ± EPM seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No terço médio dos alvéolos de SHR tratados com atenolol (Tab.9, Fig.20) foi observado aumento da DMO média e máxima ao 42º dia quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico e diminuição da DMO média e mínima ao 21º dia quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico. Quando comparados os grupos SHR e SHR tratado com atenolol, foi observado aumento da DMO média, mínima e máxima aos 7º, 14º e 28º dias e da DMO média e mínima ao 42º dia no grupo tratado com atenolol.

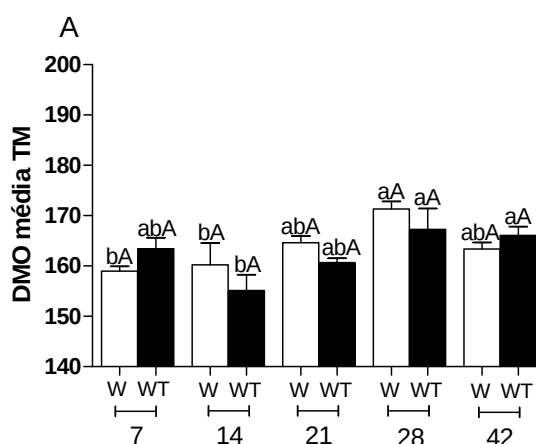


FIGURA 19- Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas, comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9- Densidade mineral óssea do terço médio de SHR e SHR tratados com atenolol

DIAS	DMO MÉDIA		DMO MÍNIMA		DMO MÁXIMA	
	SHR	SHR+	SHR	SHR+	SHR	SHR +
	ATENOLOL		ATENOLOL		ATENOLOL	
7	164,0 $\pm$ 4,9abB	179,0 $\pm$ 3,0aA	153,2 $\pm$ 5,4aB	167,4 $\pm$ 3,4aA	180,4 $\pm$ 4,1aB	191,8 $\pm$ 2,6abA
14	166,1 $\pm$ 2,5abB	177,7 $\pm$ 2,7abA	149,6 $\pm$ 3,7aB	164,6 $\pm$ 3,0abA	182,6 $\pm$ 1,1aB	193,2 $\pm$ 2,2abA
21	171,2 $\pm$ 0,8aA	167,0 $\pm$ 2,8bA	155,0 $\pm$ 1,2aA	151,2 $\pm$ 2,9bA	188,2 $\pm$ 1,2aA	184,8 $\pm$ 3,0bA
28	159,4 $\pm$ 1,8bB	171,1 $\pm$ 1,0abA	142,4 $\pm$ 2,2aB	159,6 $\pm$ 6,1abA	181,6 $\pm$ 1,4aB	190,2 $\pm$ 1,5abA
42	170,6 $\pm$ 2,7abB	179,3 $\pm$ 3,7aA	152,2 $\pm$ 2,8aB	163,2 $\pm$ 4,9abA	189,6 $\pm$ 2,4aA	194,6 $\pm$ 2,7aA

Médias $\pm$ EPM seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

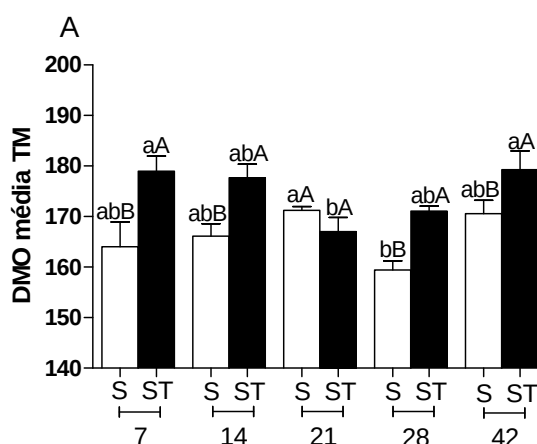


FIGURA 20- Densidade mineral óssea (DMO) média do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise histomorfométrica do terço médio do alvéolo de ratos não-tratados e tratados com atenolol.

Percentual de tecido ósseo

O aumento do percentual ósseo foi proporcional à evolução do processo em alvéolos de ratos Wistar tratados com atenolol, de forma semelhante ao observado em Wistar sem tratamento: houve aumento deste percentual aos 14º, 21º, 28º e 42º dias, quando comparado com o 7º dia pós-cirúrgico. Aos 28º e 42º dias foi observado um aumento quando comparado ao 14º dia, e ainda um aumento no 42º dia quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico (Tab.10, Fig.21). Quando comparados os grupos Wistar e Wistar tratado com atenolol, não foi encontrada diferença entre os aumentos associados aos períodos analisados (Tab.10, Fig.21).

Tabela 10- Percentual de tecido ósseo em Wistar e Wistar tratado com atenolol

% TECIDO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR	WISTAR +ATENOLOL
7	10,13±1,47dA	16,94±3,62dA
14	31,16±4,26cA	30,48±1,49cA
21	40,28±3,18bcA	39,77±3,69bcA
28	49,34±2,08abA	47,40±4,47abA
42	57,25±2,15aA	56,53±2,48aA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

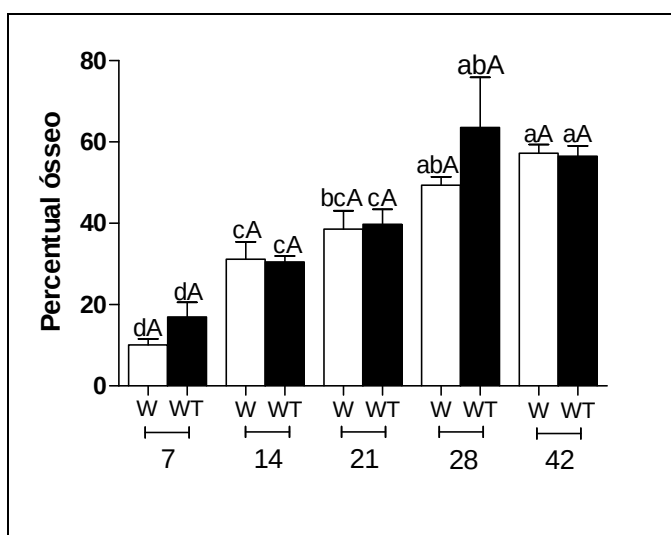


FIGURA 21- Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas, comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O percentual ósseo em alvéolos de SHR tratados com atenolol comportou-se da mesma forma que SHR sem tratamento: houve aumento aos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico, aumento também aos 21º, 28º e 42º dias quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico (Tab.11; Fig.22).

Tabela 11- Percentual de tecido ósseo em ratos SHR e SHR tratado com atenolol

% Tecido ósseo		
DIAS	SHR	SHR +ATENOLOL
7	4,65±1,43cA	7,05±1,78cA
14	20,53±2,42bA	24,66±3,68bA
21	38,88±2,70aA	44,00±5,53aA
28	35,66±3,79aA	44,04±5,65aA
42	46,10±1,36aA	53,55±2,88aA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quando comparados os grupos SHR e SHR tratado com atenolol não foi encontrada diferença estatística entre os períodos (Tab.11; Fig.22).

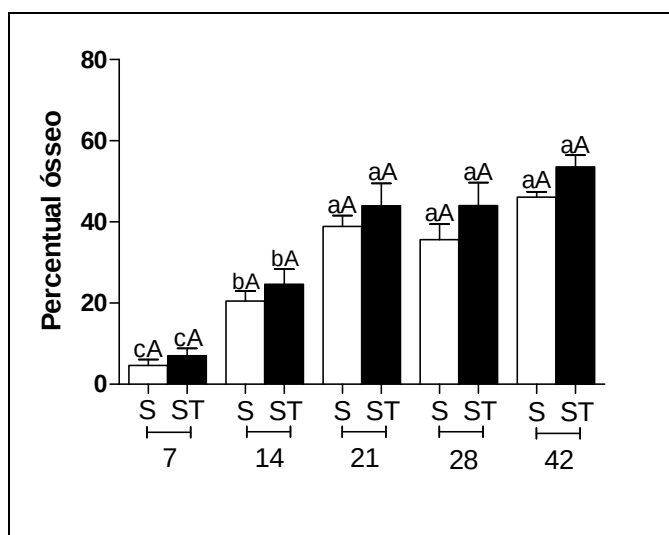


FIGURA 22- Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas, comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Trabeculado ósseo – Espessuras das trabéculas

Em Wistar tratados com atenolol foi observado aumento do trabeculado ósseo ao 21º, 28º e 42º dia quando comparados ao 7º dia pós-cirúrgico e aumentos ao 21º, 28º e 42º dia quando comparados ao 14º dia pós-cirúrgico. Ao 28º dia foi observado também aumento da espessura das trabéculas ósseas quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico e no 42º dia observado aumento com relação ao 21º dia pós-cirúrgico. (Tab.12; Fig.23).

A comparação da espessura do trabeculado ósseo entre os grupos não tratados e tratados revelou diminuição ao 14º dia, mas aumento ao 28º dia pós-cirúrgico nos alvéolos de Wistar tratados com atenolol (Tab.12; Fig.23). A espessura das trabéculas ao 28º dia em alvéolos de Wistar tratados foi semelhante à observada em alvéolos de Wistar tratados ao 42º dia pós-exodôntico.

Tabela 12- Espessura do trabeculado ósseo em ratos Wistar e Wistar tratado com atenolol

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO (µm)		
DIAS	WISTAR	WISTAR + ATENOLOL
7	41,30±1,83cA	39,09±1,61cA
14	65,42±5,97bA	47,75±1,46cB
21	77,71±4,61bA	78,99±4,82bA
28	72,34±4,45bB	102,99±6,50aA
42	111,87±4,49aA	115,72±4,87aA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

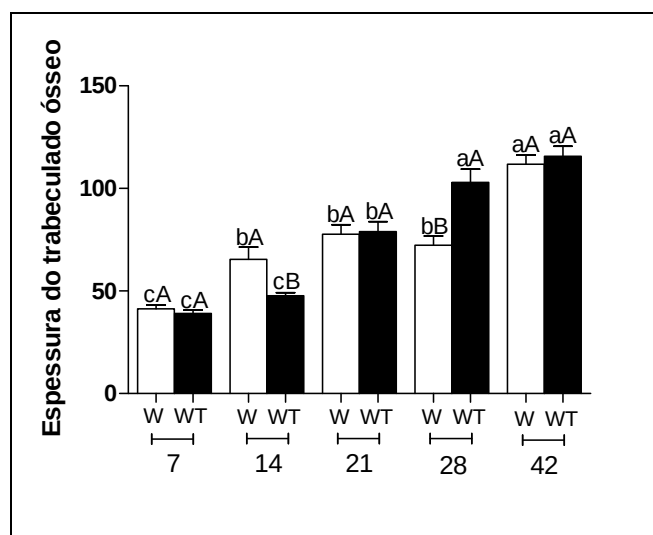


FIGURA 23- Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar (W) e Wistar tratado com atenolol (WT). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas, comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em SHR tratado com atenolol, foi observado aumento do trabeculado ósseo no terço médio alveolar aos 14º, 21º, 28º e 42º dias quando comparados ao 7º dia pós-cirúrgico, e aumento aos 21º, 28º e 42º dias quando comparados ao 14º dia pós-cirúrgico. Ao 28º dia foi observado aumento da espessura das trabéculas ósseas quando comparado ao 21º dia pós-cirúrgico e ao 42º dia, aumento em relação ao 21º dia pós-cirúrgico (Tab.13; Fig.24).

A comparação da espessura do trabeculado ósseo entre os grupos, revelou um aumento significativo aos 28º e 42º dias pós-cirúrgicos em SHR tratado com atenolol (Tab.13; Fig.24). Este aumento poderia ser associado ao aumento da DMO média observada nos mesmos períodos em ratos SHR tratados com atenolol. Estes aumentos poderiam abolir as diferenças observadas entre SHR e Wistar.

Tabela 13- Espessura do trabeculado ósseo em ratos SHR e SHR tratado com atenolol

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO (μm)		
DIAS	SHR	SHR + ATENOLOL
7	29,09 $\pm$ 1,51dA	27,31 $\pm$ 0,30dA
14	56,60 $\pm$ 1,86cA	58,25 $\pm$ 3,46cA
21	80,20 $\pm$ 2,35bA	87,49 $\pm$ 4,03bA
28	75,22 $\pm$ 2,46bB	103,11 $\pm$ 2,72aA
42	99,18 $\pm$ 3,43aB	111,75 $\pm$ 2,06aA

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

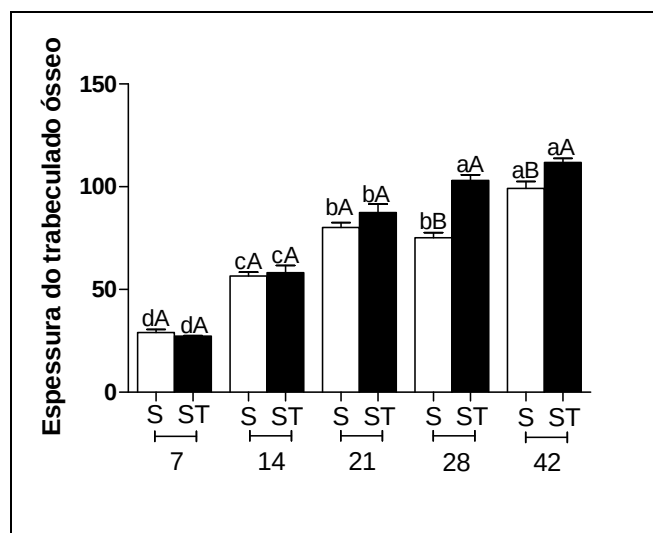


FIGURA 24- Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de SHR (S) e SHR tratado com atenolol (ST). As barras representam a média $\pm$ EPM dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. Letras distintas, minúsculas, comparação entre os períodos e maiúsculas, comparação entre os grupos, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise qualitativa histológica

7 DIAS

No terço médio de alvéolos de ratos Wistar tratados com atenolol, foi evidenciada a presença de trabéculas ósseas neoformadas delgadas e pouco organizadas (Fig.7K) que não diferiram das trabéculas observadas em alvéolos de ratos sem tratamento (Fig.7A).

Em SHR tratados com atenolol, no terço médio do alvéolo, foram notadas pequenas espículas ósseas neoformadas com osteoblastos em suas bordas (Fig. 7P). Observa-se a presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas, ocupando regularmente o espaço (Fig.7P). O amplo espaço entre o trabeculado ósseo, encontra-se ocupado por tecido conjuntivo com moderado número de fibroblasto. Esta análise não diferiu da feita em alvéolos de ratos SHR sem tratamento.

14 DIAS

Nos terços médios de ratos Wistar tratados com atenolol, as trabéculas ósseas neoformadas são espessas, permanecendo ainda discretas áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Fig. 7L).

Em SHR tratados com atenolol, no terço médio observa-se a presença de delgadas trabéculas ósseas isoladas. Nota-se a permanência de extensas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, exibindo moderado número de fibroblastos (Fig.7Q).

21 DIAS

Em ratos Wistar tratados com atenolol, junto ao terços médio do alvéolo, observou-se à presença de trabéculas ósseas espessas, permanecendo ainda pequenas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Fig.7M).

Ao nível do terço médio em SHR tratados com atenolol, as trabéculas ósseas neoformadas são mais regulares (Fig.7R). Nos alvéolos de SHR tratados, as áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e exibindo moderado número de fibroblastos foram pequenas se comparadas às observadas no terço médio alveolar de SHR sem tratamento (Fig.7H). No entanto, esta diferença não foi suficiente para alterar os valores de DMO média, percentual ósseo ou de espessura das trabéculas medidas neste dia nos alvéolos de ratos SHR tratados.

28 DIAS

Junto ao terço médio de ratos Wistar tratados com atenolol, as trabéculas ósseas neoformadas são espessas, observando-se, no entanto, algumas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Fig. 7N).

Em SHR tratados com atenolol, o tecido ósseo neoformado ocupa toda extensão dos terços médio (Fig. 7S), apesar da permanência de pequenas áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. O tamanho das áreas com tecido conjuntivo seria menor que as observadas em alvéolos de ratos SHR sem tratamento (Fig.7I).

42 DIAS

O alvéolo dental de ratos Wistar tratados com atenolol, ao longo de toda sua extensão, encontra-se ocupado por trabéculas ósseas bem desenvolvidas. Observa-se, no entanto, discretas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Fig.7O).

Em SHR tratados com atenolol, o alvéolo dental, ao longo de toda sua extensão, acha-se preenchido por trabéculas ósseas bem desenvolvidas (Fig.7T).

Diferente do observado nas análises de DMO, percentual e espessura das trabéculas, verificamos que a análise qualitativa não demonstrou diferenças importantes entre os grupos não tratados e tratados.

Avaliação da expressão das proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9 em alvéolos de ratos tratados com atenolol

Comparando os grupos, verificamos que a marcação para OPG foi significativamente menor aos 14º e 21º dias pós-cirúrgico em alvéolos de Wistar tratado com atenolol (Fig.10L,M).

Estes resultados foram bastante distintos dos observados em ratos hipertensos. Em alvéolos de SHR, o tratamento com atenolol promoveu aumento significativo da marcação para OPG aos 7º e 42º dias pós-cirúrgico (Tab.14, Figs.10P,T e 25). Ao avaliarmos os resultados, verificamos que este aumento ocorreria também nos períodos dos 14º, 21º e 28º dias pós-cirúrgicos, apesar de não ser estatisticamente significativo. Uma disposição aumentada e paralela entre os

gráficos dos *scores* atribuídos aos diferentes períodos avaliados, é observada entre SHR não tratados e tratados.

Tabela 14- Expressão da proteína OPG em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol

DIAS	WISTAR	WISTAR T	SHR	SHR T
7	2 aA	1 abA	1 aA	2 aB
14	2 aA	0 aB	1 aA	2 aA
21	2 aA	0 aB	1 aA	2 aA
28	1 aA	2 bA	1 aA	3 aA
42	2 aA	1 abA	2 aA	3 aB

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

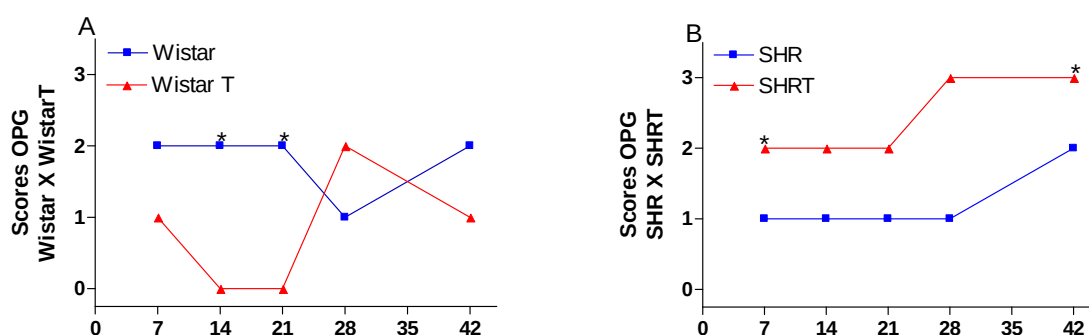


FIGURA 25- Gráficos da análise da imunomarcção para OPG durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B). Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos. * Mann Whitney $p < 0,05$.

Não houve alteração da marcação para RANKL, entre os períodos de reparo alveolar no grupo de ratos Wistar tratados com atenolol (Tab.15, Figs.11K-O e 26) conforme observado em alvéolos de Wistar controles. Comparando os grupos, foi

observado que o tratamento com atenolol aumentou a marcação para RANKL especificamente ao 28º dia pós-cirúrgico (Tab15, Figs.11H,R,J,T, 26).

Conforme descrito anteriormente, a marcação para RANKL em alvéolos de SHR foi maior no 28º dia quando comparado aos outros períodos analisados. No grupo SHR tratado, a marcação para RANKL aumentou ao 21º dia quando comparado ao 7º dia pós-cirúrgico (Tab.15, Figs.11P,R, 26). Aumento expressivo (1 para 3) da marcação para RANKL foi observado aos 21º e 42º dias em alvéolos de SHR tratados com atenolol.

Tabela 15- Expressão da proteína RANKL em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol.

DIAS	RANKL			
	WISTAR	WISTAR T	SHR	SHR T
7	1 aA	1 aA	1 abA	1 aA
14	1 aA	1 aA	1 abA	2 abA
21	1 aA	1 aA	1 aA	3 bB
28	1 aA	2 aB	3 bA	2 abA
42	1 aA	1 aA	1 abA	3 abB

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

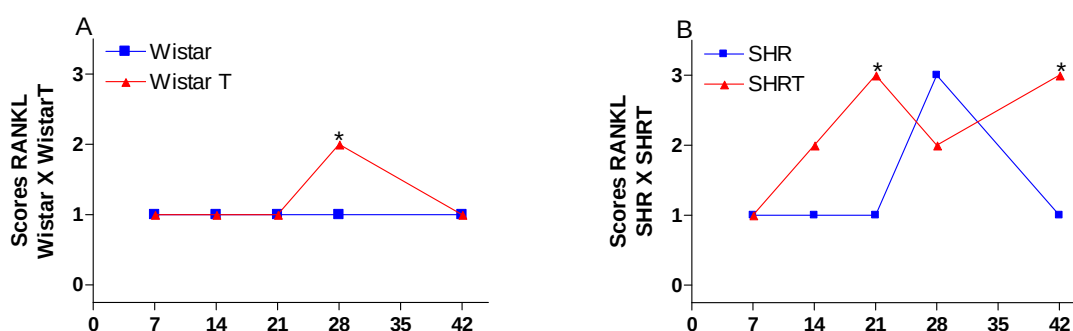


FIGURA 26- Gráficos da análise da imunomarcação para RANKL durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B). Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos.

*Mann Whitney $p < 0,05$.

Nos grupos Wistar tratados e SHR tratados não houve diferença na marcação para RANK entre os períodos analisados (Tab.16, Figs.12K-T, 27) . Não houve diferença da marcação para RANK entre os grupos Wistar e Wistar tratados (Tab.16, Figs.12K-O, 27). Um aumento na marcação da RANK foi observado ao 21º dia de reparo alveolar em ratos SHR tratados quando comparados aos ratos SHR sem tratamento (Tab.16, Fig.27).

Tabela 16- Expressão da proteína RANK em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol

RANK				
DIAS	WISTAR	WISTAR T	SHR	SHR T
7	1 aA	1 aA	1 abA	1 aA
14	0 aA	0 aA	2 aA	1 aA
21	1 aA	1 aA	1 bA	2 aB
28	1 aA	1 aA	2 aA	2 aA
42	1 aA	0 aA	1 abA	1 aA

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

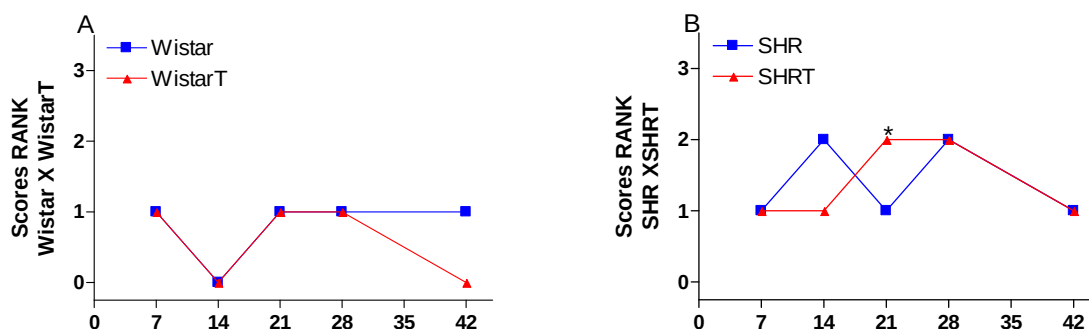


FIGURA 27- Gráficos da análise da imunomarcação para RANK durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B). Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos. *Mann Whitney $p < 0,05$.

Avaliando os resultados obtidos nos alvéolos de grupos tratados, verificamos que a MMP-9 não apresentou diferença significativa em sua marcação nos diferentes

períodos analisados entre alvéolos de ratos Wistar e Wistar tratados (Tab.17, Figs.13A-E,K-O,28). Porém, em SHR tratados a marcação foi mais intensa do que em SHR não tratados ao 21º e ao 42º dia, não sendo alterada ao 28º dia, período que já apresentava alta marcação em SHR sem tratamento (Tab.17, Figs.13F-J,P-T e 28)

Tabela 17- Expressão da proteína MMP-9 em alvéolos de ratos Wistar e SHR não tratados e tratados com atenolol

MMP9				
DIAS	WISTAR	WISTAR T	SHR	SHR T
7	1 aA	1 aA	3 abA	1 aA
14	1 aA	1 aA	2 abA	2 abA
21	1 aA	1 aA	1 abA	2 bB
28	2 aA	2 aA	2 aA	2 abA
42	1 aA	1 aA	1 bA	2 abB

Medianas seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ou Mann Whitney ($p < 0,05$).

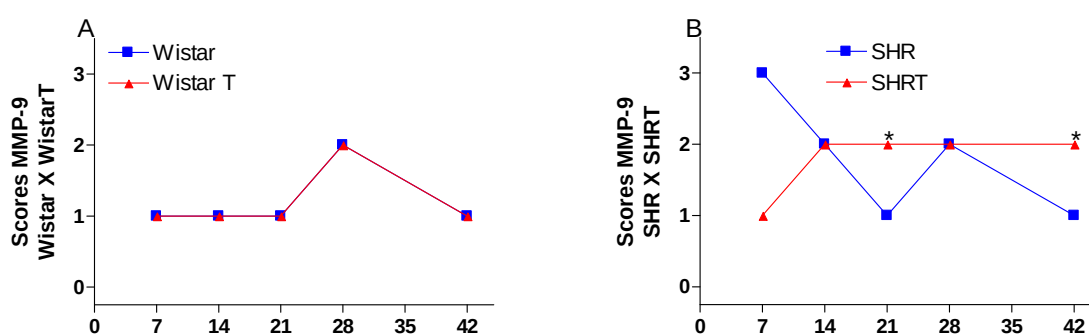


FIGURA 28- Gráficos da análise da imunomarcação para MMP-9 durante o processo de reparo alveolar (7 a 42 dias) em ratos Wistar e Wistar tratados (A) e em SHR e SHR tratados (B). Os pontos representam a mediana dos escores atribuídos. *Mann Whitney $p < 0,05$.

Discussão

DISCUSSÃO

O estudo do processo de reparo alveolar tem sido considerado importante para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação óssea e também pode ser considerado como um indicador sensível do efeito de diferentes condições experimentais sobre estes mecanismos (CARVALHO; OKAMOTO, 1987; HSIEH et al., 1994; HSIEH et al., 1995). Em nosso estudo, todas as análises foram realizadas no terço médio do alvéolo dental, por ser a região onde o processo de reparo ocorreria de maneira mais uniforme (CARVALHO; OKAMOTO, 1987), uma vez que no terço apical, este processo poderia ser eventualmente modulado pela presença de células remanescentes do dente removido, e no terço cervical, poderia ser alterado por fatores externos e pelo trauma inerente ao procedimento cirúrgico.

Ao avaliar o terço médio, os resultados demonstraram que há uma importante diferença na formação óssea observada ao final do processo de reparo alveolar em SHR, quando comparado aos ratos Wistar.

A análise densitométrica realizada em nosso estudo não mostrou aumento da DMO gradual e proporcional à seqüência de dias pós-operatórios exodônticos, que deveriam estar diretamente associado ao aumento da quantidade de tecido ósseo neoformado nos alvéolos. No entanto, foi observado um aumento significativo da DMO ao 28º dia no terço médio dos alvéolos de ratos normotensos em relação aos períodos iniciais (dias 7 e 14). Resultados semelhantes foram apresentados por Guglielmotti e Cabrini (1985) ao avaliarem, por métodos radiográficos, o reparo ósseo alveolar em ratos Wistar, em uma área restrita ao terço apical. Baseados em análises qualitativas dos resultados obtidos, estes autores descreveram que ao 14º dia o alvéolo estaria quase completamente preenchido por tecido radiopaco e, ao 30º dia, a imagem radiopaca seria observada em toda a extensão da área analisada, não sendo possível distinguir as paredes do alvéolo. Ambos os estudos demonstraram que a análise radiográfica apresenta sensibilidade suficiente para detecção de formação óssea mais compacta, observada ao final do processo de reparação alveolar em ratos Wistar. O emprego de técnicas mais específicas, como microtomografia, permitiria a avaliação da formação óssea mais delgada associadas às fases iniciais do processo.

Em nosso estudo, utilizando análise histomorfométrica, foi possível também detectar aumento de formação óssea associado ao final do processo de reparo alveolar, sendo os maiores percentuais ósseos observados aos 28º e 42º dias em relação ao 7º dia pós-operatório, sem diferenças significativas deste percentual observada entre os períodos intermediários. Estudos histométricos conduzidos anteriormente ao nosso, também não conseguiram demonstrar diferenças na quantidade de tecido ósseo formado em alvéolos de ratos Wistar nas 1ª, 2ª e 3ª semanas após a cirurgia (YUGOSH et al., 2002), mas observaram, como nós, que a neoformação óssea continua além do 21º dia pós-cirúrgico (CARVALHO et al., 1997) e que, ao 42º dia, a formação de tecido ósseo seria mais compacta.

Nossos resultados histomorfométricos corroboram esses achados ao mostrar aumento significativo na espessura das trabéculas ósseas no terço médio ao 42º dia com relação ao 28º dia pós-cirúrgico e porcentagem óssea aumentada nesses dois momentos quando comparada aos períodos iniciais do reparo alveolar. Diferente das análises quantitativas (radiográficas e histomorfométricas), a análise qualitativa histológica do processo permitiu a observação seqüencial da formação óssea no alvéolo dental de ratos. Conforme descrito, pode ser determinado um aumento progressivo de formação óssea desde os períodos iniciais culminando em aumento da quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado nos períodos finais, 28º e 42º dias pós-operatórios. Juntos, os resultados das diferentes análises realizados no presente estudo, demonstram que há significante formação óssea ao final do processo de reparo alveolar (28º e 42º dias pós-operatórios) em ratos normotensos Wistar. Esses resultados corroboram a sugestão que este processo é finalizado entre 21-60 dias, sendo encontrada maior densidade mineral óssea ao 28º dia pós-cirúrgico (PIETROKOVISK et al., 1967).

Em alvéolos de SHR, a redução da DMO média ao 28º dia em relação ao 21º com subsequente aumento dos valores no 42º dia, sugere primeiramente que o processo de reparo em ratos hipertensos não segue o mesmo padrão de evolução observado em alvéolos de ratos normotensos. A associação destes resultados a menor DMO ao 28º dia, ao menor percentual ósseo observado aos 14º, 28º e 42º dias e menor espessura das trabéculas aos 7º e 42º dias em alvéolos de SHR, além da presença de áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea ainda presentes no 28º dia, sustentam a sugestão de que o reparo alveolar está atrasado em ratos hipertensos SHR.

O atraso do processo de reparo alveolar, caracterizado por tecido ósseo imaturo formado entre 9 e 21 dias pós-operatórios, também foi detectado em alvéolos de ratos hipertensos renais (modelo Goldblatt, 1 rim-1clip) (CARVALHO et al., 1983).

Vários estudos, experimentais e clínicos, têm sugerido que a hipertensão apresenta efeitos prejudiciais na qualidade e densidade de tecidos ósseos (AFGHANI; GORAN, 2007; IZAWA et al., 1985; VESTERGAARD et al., 2009), uma vez que a diminuição do volume ósseo trabecular e aumento do *turnover* ósseo têm sido observados em SHR (BARBAGALLO et al., 1991; WANG et al., 1993).

Os resultados de nosso estudo sugerem que o atraso observado em SHR seria conseqüente de uma alteração na fase de remodelação ou na reabsorção óssea uma vez que as diferenças foram observadas principalmente ao final do processo de reparo alveolar.

Para avaliarmos se proteínas associadas ao metabolismo/ *turnover* ósseo estariam envolvidas no efeito da hipertensão sobre o processo de reparação alveolar, investigamos a expressão de OPG, RANK, RANKL nos alvéolos de ratos SHR. O padrão de expressão destas proteínas foi demonstrado primeiramente em alvéolos de ratos Wistar por Coutinho (2005). Nessa dissertação, foi demonstrado que a expressão dessas proteínas ocorre em todos os períodos de reparo alveolar em ratos com maior expressão da OPG e RANKL ao 28º dia e da RANK aos 14º e 21º dias pós-operatórios.

Em nosso estudo, não identificamos diferenças no padrão de expressão da OPG, RANKL e RANK nos diferentes períodos analisados em alvéolos de Wistar. No entanto, apesar de nenhuma alteração para OPG ser observada em alvéolos de SHR a marcação contra RANKL foi maior ao 28º dia em relação ao 21º pós-operatório, e em comparação à marcação ao 28º dia em alvéolos de ratos wistar. Associado ao aumento para RANKL, maior expressão de RANK foi observada em alvéolos de SHR aos 14º e 28º dias quando comparada aos alvéolos de ratos Wistar.

A formação e ativação de osteoclastos são coordenadas pela interação do receptor RANK com seu ligante, RANKL, os quais são conhecidos por induzir reabsorção óssea fisiológica e patológica. Nossos resultados sugerem que, especificamente ao 28º dia, uma maior osteoclastogênese ou atividade osteoclástica estaria diretamente associada com a menor DMO, menor percentagem óssea e

persistência de áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea no terço médio alveolar em ratos hipertensos.

Esta sugestão é corroborada pelos resultados de expressão da proteína MMP-9. Devido a MMP-9 ser a metaloproteinase mais abundantemente expressa em osteoclastos e a principal MMP responsável pela atividade invasiva do osteoclasto (AIMES et al., 1995; HILL et al., 1994; LAUER-FIELDS et al., 2000, 2003; ZHAO et al., 1997), a marcação aumentada dessa proteína ao 28º dia em alvéolos de SHR poderia ser devido aos aumentos na densidade de população e quantidade de osteoclastos presentes no terço médio ou de uma intensa atividade de remodelação/reabsorção tecidual. Para reforçar ainda mais a sugestão de que a atividade osteoclastogênica pode estar aumentada em alvéolos de SHR, poderíamos considerar o estudo que mostrou haver maior concentração plasmática de TRAP (marcador de osteoclastos) e intensa marcação de TRAP na superfície do osso trabecular de vértebras lombares em SHR (SATO et al., 2010).

A partir destes resultados, levantamos a hipótese de que o tônus simpático periférico seria a causa determinante das alterações encontradas no reparo alveolar em SHR. Para testarmos esta hipótese, avaliamos o efeito do atenolol sobre o processo de reparo alveolar. O atenolol, um medicamento com ação anti-hipertensiva, antagoniza receptores β -adrenérgicos e modula o tônus simpático periférico.

Em ratos SHR, o tratamento com atenolol reduziu significativamente e manteve reduzida a pressão arterial sistólica (PAS) durante todos os períodos de reparo alveolar analisados. Como demonstrado anteriormente (ELIAS et al., 2008), o tratamento com atenolol não altera a PAS em ratos normotensos.

Se o atenolol na dose utilizada, reduz a ativação simpática cardiovascular, promovendo ação anti-hipertensiva eficaz em SHR, provavelmente este medicamento seria também eficaz em reverter as alterações observadas no processo de reparo alveolar caso estas estivessem associadas à hiperatividade do tônus simpático periférico (IZAWA et al., 1985; WANG et al., 1993). Evidências clínicas e experimentais sugerem que antagonistas de receptores β -adrenérgicos teriam efeito direto sobre o metabolismo ósseo (BONNET et al., 2006, 2008a, 2008b; PASCO et al., 2004; SATO et al., 2010).

Como observado em nosso estudo, o tratamento de ratos Wistar com atenolol não alterou a quantidade de tecido radiopaco presente nos alvéolos nos diferentes períodos analisados, não alterou o percentual ósseo nestes períodos, apesar de reduzir a espessura do trabeculado ósseo especificamente ao 14º dia e aumentar a espessura deste trabeculado ao 28º dia pós-cirúrgico. Comparando os resultados entre os grupos não-tratados e tratados, verificamos que o tratamento com atenolol não modificou a quantidade ou qualidade de tecido ósseo neoformado nos alvéolos de ratos Wistar. Entretanto, o efeito do atenolol sobre o reparo alveolar em SHR foi bastante expressivo, podendo ser observado aumento significativo da DMO média em praticamente todos os períodos analisados de reparação alveolar se comparada os valores observados antes do tratamento. Houve também um aumento significativo da espessura das trabéculas ósseas formadas nos períodos finais do reparo alveolar em SHR tratados.

Os resultados demonstraram que o atenolol promove efeitos distintos sobre o reparo alveolar após exodontia em ratos normotensos e hipertensos, da mesma forma que promove efeitos distintos sobre a pressão arterial nestes animais, sugerindo que a hiperatividade simpática periférica seria condição fisiológica necessária para se evidenciar os efeitos farmacológicos do atenolol.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram ainda que o tratamento com atenolol promoveu alterações muito mais expressivas na marcação das proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9 em alvéolos de ratos SHR do que em alvéolos de ratos Wistar.

Em alvéolos de SHR tratados, um aumento da marcação contra OPG foi observado no início (7º dia) e no final (42º dia) do processo de reparo alveolar, estando intensamente marcada ao 42º dia, em relação aos SHR não-tratados. Apesar do aumento não ter sido estatisticamente significativo nos períodos pós-operatórios intermediários, em alvéolos de SHR, houve uniformidade na marcação de OPG após o tratamento com atenolol, estando moderadamente marcada nos períodos associados à fase de formação (7-21 dias) e intensamente marcada nos períodos associados à remodelação óssea. Pelo fato da OPG ser considerada um fator modulador da osteoclastogênese, o aumento da imunomarcação para OPG observada em alvéolos de SHR tratados com atenolol poderia levar a redução da atividade osteoclastogênica, se admitirmos que esta atividade estivesse aumentada em alvéolos de ratos SHR sem tratamento, e assim contribuir para formação de

maior quantidade de tecido ósseo e maior espessura das trabéculas ósseas durante o processo de reparo alveolar em SHR tratados. Esta sugestão é reforçada pelos resultados obtidos em Wistar tratados com atenolol. Em alguns períodos do reparo (14º e 21º dia), nenhuma marcação para OPG foi observada e em outros, as marcações foram fracas e moderadas, como observadas anteriormente nos alvéolos de ratos Wistar sem tratamento. Como a atividade osteoclastogênica não estaria alterada em alvéolos de ratos Wistar sem tratamento, as alterações na marcação de OPG observadas após tratamento com atenolol, não teriam sido suficientes para alterar a neoformação óssea.

Em alvéolos de SHR, o tratamento com atenolol aumentou também a marcação de RANKL aos 21º e 42º dias, sem alterar a marcação desta proteína ao 28º dia. Marcação moderadas e intensas de RANKL foram observadas do 21º dia até o final do processo de reparo alveolar em SHR tratados com atenolol, o que não era observado em alvéolos de SHR não-tratados. Estes dados demonstraram que o tratamento com atenolol não reduz a formação de RANKL. Este resultado poderia ser considerado controverso ao consideramos que o propranolol e outros antagonistas β 2-seletivos reduzem a formação de osteoclastos estimulada por agonistas adrenérgicos (AITKEN et al., 2009). Porém, não foi demonstrado que estes antagonistas interferem diretamente na formação de RANKL. Diferente do observado para RANKL, o tratamento com atenolol aumentou a marcação de RANK em alvéolos de SHR de maneira menos expressiva e especificamente no 21º dia, mantendo-se entre fraca e moderada nos diferentes períodos avaliados.

A aumentada marcação contra RANKL em alvéolos de SHR tratados não invalida a sugestão anterior de que o atenolol reduziria a atividade osteoclastogênica levando ao aumento da formação óssea alveolar nestes animais, uma vez que, marcação aumentada contra OPG também foi observada em alvéolos de SHR tratados. Tem sido descrito que OPG modula negativamente a ligação de RANKL ao seu receptor RANK (SIMONET et al., 1997).

Nenhuma alteração foi evidenciada sobre a marcação de MMP-9 em alvéolos de ratos Wistar tratados, no entanto, o atenolol promoveu aumento na marcação de MMP-9 aos 21º e 42º dias, sem alterar a moderada marcação ao 28º dia, em alvéolos de ratos SHR. Assim como observado para OPG e RANKL, marcações mais uniformes para MMP-9 foram observadas a partir do 14º dia de reparo alveolar

em alvéolos de ratos SHR tratados com atenolol, indicando metabolismo associado a maior formação óssea alveolar.

A partir destas observações, poderíamos sugerir que o aumento da formação de tecido ósseo e das espessuras de trabéculas ósseas em alvéolos de SHR tratados com atenolol seria consequente da redução de osteoclastogênese ou da atividade osteoclastogênica, ou do aumento de osteogênese, mediados pelo expressivo aumento de OPG nas fases de formação e remodelação óssea.

A partir deste estudo demonstramos pela primeira vez que o tratamento com 100mg/Kg/dia de atenolol, um antagonista seletivo de receptores β 1-adrenérgico, reduz a pressão arterial e aumenta a formação óssea em alvéolos dentais de ratos SHR.

O efeito anti-osteoporótico de drogas antagonistas de receptores β -adrenérgicos, como o propranolol, tem sido associado à utilização de baixas doses (0,1- 5 mg/Kg/dia) enquanto que o efeito anti-hipertensivo em SHR, tem sido observado com altas doses deste medicamento (30-100 mg/kg/dia). Antonaccio et al. (1986), Bonnet et al. (2006, 2008a), Takeda e Buñag (1980) e Sato et al. (2010) demonstraram que o tratamento, por via oral, de SHR com 1 e 5 mg/Kg/dia de propranolol durante 12 semanas aumentava a massa óssea da vértebra lombar e da tíbia, sem alterar a pressão arterial, e que 50 e 100 mg/Kg/dia, não promovia o mesmo efeito sobre os ossos mas reduzia a pressão arterial de SHR. Baixas doses de propranolol promoveriam ação antagônica mais seletiva sobre receptores adrenérgicos do tipo β 2, expressos também em osteoblastos e osteoclastos (ARAI et al., 2003; BONNET et al., 2008b; MOORE et al., 1993; TOGARI et al., 2002, TOGARI, 1997). Estes resultados sugeriram que o efeito destes medicamentos sobre os ossos seria causado pelo bloqueio de receptores β 2-adrenérgicos. Entretanto, estudos experimentais com camundongos deficientes (*knockout*) de receptores β 1 e β 2 mostraram uma marcante inibição dos índices de formação óssea (PIERROZ et al., 2005 apud BONNET et al., 2008a), sugerindo que os maiores índices de formação óssea observados em camundongos deficientes de β 2 dependem da funcionalidade de receptores β 1.

Apesar de não ser bem compreendido o papel de receptores β 1-adrenérgicos no metabolismo ósseo, sua presença foi demonstrada em osteoblastos, osteoclastos e macrófagos (AITKEN et al., 2009), embora com expressão significativamente

menor que os receptores $\beta 2$. Além disto, o uso de antagonistas $\beta 1$ -adrenérgicos, como medicamentos anti-hipertensivos, também foi associado a menores índices de fraturas decorrentes de osteoporose em mulheres menopausadas (REID et al., 2005).

Em nosso estudo mostramos que o atenolol promove aumento da formação óssea em alvéolos de SHR. O aumento da expressão de OPG, RANK, RANKL e também de MMP-9 em alvéolos de ratos SHR tratados com atenolol, sugere que receptores $\beta 1$ -adrenérgicos participam dos mecanismos envolvidos no metabolismo ósseo alveolar de SHR.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que:

- O reparo alveolar está atrasado em SHR,
- As proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9 participam dos mecanismos associados ao atraso do processo de reparo alveolar em SHR,
- O tratamento com atenolol reduz a pressão arterial e normaliza a formação óssea em alvéolos de SHR,
- O tratamento com atenolol aumenta a marcação contra OPG, RANKL, RANK e MMP-9 em SHR.

Nossos dados sugerem que o atraso no reparo alveolar observado em SHR estaria associado ao aumento do tônus simpático periférico descrito nestes animais. Neste atraso, alterações na formação e remodelação óssea alveolar estariam associadas à expressão diferencial de proteínas do metabolismo ósseo OPG, RANKL, RANK e MMP-9, a qual é modulada pelo efeito do atenolol.

Referências

REFERÊNCIAS

Afghani A, Goran MI. Lower bone mineral content in hypertensive compared with normotensive overweight latino children and adolescents. *Am J Hypertens* 2007;20(2):190-6.

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; 270(11):5872-6.

Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. β 2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 482(1-2):96-103.

Amler MH. The age factor in human extraction wound healing. *J Oral Surg*. 1977;35(3):193-7.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960;61(7):32-44.

Antonaccio MJ, High J, DeForrest JM, Sybertz E. Antihypertensive effects of 12 beta adrenoceptor antagonists in conscious spontaneously hypertensive rats: relationship to changes in plasma renin activity, heart rate and sympathetic nerve function. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238(1): 378-87.

Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, Yamamoto S, Togari A. Effects of β -adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1640(2-3):137-42.

Asseur R, Sabatier JP, Potrel-Burget C, Lecoq B, Creveuil C, Marcelli C. Sympathetic nervous systems as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine*. 2003;70 (6):515-9.

Astrand P, Carlsson GE. Changes in the alveolar process after extractions in the withe rat: a histologic and fluorescence microscopic study. *Acta Odontol Scand*. 1969;27(1):113-27.

Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, Barbagallo CM, Boiardi L, Passeri G, et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. 1991;2(1):15-17.

Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TED, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol*. 2010; 81(7): 1075-83.

Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993; 75(3):367-72.

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

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

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

Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966; 21(6):805-13.

Brasil. Ministério da Saúde. Hipertensão avança e atinge 24,4% dos brasileiros [citado em 2010 abr. 26]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11290.

Cabrera MA. Estudo histológico do processo de reparo de alvéolos dentais em ratos desidratados [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 1982.

Carvalho AA, de Castro AL, Melhado RM, Bedran de Castro JC. Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension: a histological study. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1983; 25(3):214-20.

Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana; 1987.

Carvalho ACP, Okamoto, T. Cuidados pós-exodônticos: considerações clínicas e experimentais. *Ars Cvrandi Odontol*. 1978; 5(1):19-27.

Carvalho ACP, Okamoto T. Estudo preliminar sobre os efeitos de anticonceptivo no processo de reparo em feridas de extração dental em ratas. *Ars Cvrandi Odontol*. 1981;8(2):60-8.

Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J*. 1997; 8(1):9-12.

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

Claflin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1936;23(6):945-959.

Coutinho CCC. Expressão das proteínas osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos: estudo imunoistoquímico [dissertação].

Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontogia de Araçatuba; 2005.

Crespi R, Cappare P, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *J Periodontol*. 2009;80(2):210-8.

Dayan D, Bodner L, Horowitz I. Effect of salivary gland hypofunction on the healing of extraction wounds: a histomorfometric study in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992; 50(4):354-8.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31(6):641-5.

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

Elias GP, Sassaki KT, Delbem ACB, Antoniali C. Atenolol reduces salivary activity in pups of spontaneously hypertensive and normotensive rats treated during pregnancy and lactation. *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30(2):133-41.

Elmqvist JK, StrewlerGJ. Do the neural signals remodel bone? *Nature*. 2005; 434:447-448.

Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Line SR, Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol*. 2002 ;47(3):203-9.

Giglio MJ, Gurustovich A, Guglielmotti MB. Bone healing under experimental anemia in rats. *Acta Odont Latinoamer*. 2000; 13(2):63-72.

Gorustovich AA, Steimetz T, Ielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec.* 2008; 291(4):441-7.

Grandini, S.A. The effects of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent tooth extraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978; 45(2):190-9.

Grandini SA, Migliorini RH, Okamoto T. Processo de reparo em feridas de extração dental em ratos com diabetes aloxânico. *Bol Fac Farm Odontol Ribeirão Preto.* 1970; 7(1):47-71.

Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985; 43(5):359-64.

Haddad A, Hetem S, Brandão HJJ, Pinto RS. A tetraciclina no processo de reparo em feridas de extração dental em ratos. *Rev. FOA.* 1965; 1(2):33-42.

Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci* 1994;107(pt. 11):3055-64.

Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol.* 1995;40(6):529–31.

Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol.* 1994;39(5):425–8.

Huebsch RF, Hansen LS. A histopathologic study of extraction wounds in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969;28(2):187-96.

Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; Suppl.22(1): S242-3.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int*. 1985;37(6):605-7.

Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand*. 1970;28(4):441-61.

Johansen JR, Gilhuus-Moe O. Repair of the post-extraction alveolus in the guinea pig: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand*. 1969;27(3):249-62.

Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M, Ogasakawa M, Kaneko H, Sato T, et al. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-Kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol*. 2000;165(8):4254-63.

Klemora R, Huttunen P, Laine M, Weckström M, Hirvonen J. Catecholamines in pericardial fluid of normotensive, spontaneously hypertensive and reserpine-treated rats. *Acta Physiol Scand*. 1999; 165(3):293-7.

Lauer-Fields JL, Sritharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem* 2003; 278(20):18140-5.

Lauer-Fields JL, Tuzinski KA, Shimokawa K, Nagase H, Fields GB. Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2000; 275(18):13282-90.

Leite CLA, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2005; 27(6):523-31.

Loutzenhiser R, Bidani A, Chilton L. Renal myogenic response: kinetic attributes and physiological role. *Circ Res*. 2002;90(12):1316-24.

Lucas PA, Brown RC, Drueke T, Lacour B, Metz JA, McCarron DA. Abnormal vitamin D metabolism intestinal calcium transport, and bone calcium status in the spontaneously hypertensive rat compared with its genetical control. *J Clin Invest* 1986;78(1):221-7.

Luvizuto ER , Queiroz TP, Dias SMD , Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia JR IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(1):52-9.

Mancia G, Grassi G. Antihypertensive treatment: past, present and future. *J Hypertens Suppl*. 1998;16(1):S1-7.

Mendes RM, Silva GAB, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(12):1155-6 2.

Minkowitz B, Boskey AL, Lane JM, Pearlman HS, Vigorita VJ. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J Orthop Res*. 1991;9(6):869-75.

Moore RE, Smith CK 2nd, Bailey CS, Voelkel EF, Tashjian AH Jr. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner*. 1993; 23(3):301-15.

Muntner P, He J, Roccella EJ, Whelton PK. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the US population. *Hypertension*. 2002;39(4):897-902.

Nagatsu I, Nagatsu T, Mizutani K, Umezawa H, Matsuzaki M, Takeuchi T. Adrenal tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase in spontaneously hypertensive rats. *Nature*. 1971; 230(5293):381-2.

Nagatsu T, Kato T, Numata Y, Keiko I, Umezawa H. Serum dopamine β -hydroxylase activity in developing hypertensive rats. *Nature* 1974; 251(5476):630-1.

Naito S, Ito M, Sekine I, Ito M, Hirano T, Iwasaki K, et al. Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). *Bone*. 1993;14(5):745-53.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, RankL in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 241-4.

Okamoto K, Aoki K. Development of strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-93.

Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba*. 1973; 2(2):153-69.

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

Passos VMA, Assis TD, Barreto SM. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiol Serv Saúde*. 2006;15(1):35-45.

Pereira AC, Amadei SU, Silveira VAS, Balducci I, Faig-Leite H. Estudo comparativo da porcentagem das áreas cortical, trabecular e do canal medular do fêmur de ratos hipertensos (SHR) e normotensos. *Cienc Odontol Bras*. 2007;10(1):64-9.

Peterson LJ. Princípios da exodontia não complicada. In: Peterson LJ, editor. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000, p. 118-66.

Pietrokovski J, Massler M. Residual ridge remodeling after tooth extraction in monkeys. *J Prosthet Dent*. 1971;26(2):119-29.

Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res*. 1967;46(1):222-31.

Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats: a histological study. *Braz Dent J*. 2002; 13(1):3-9.

Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2000;3(3):145-52.

Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, et al. B-blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(4):613-18.

Rezende MCRA, Okamoto T. Influência do “stress” no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odontol UNESP*. 1989; 18(1-2):119-30.

Saad Neto M, Okamoto T, Callestini EA, Carvalho ACP. Influência da irrigação do alvéolo dentário com anestésicos locais, na cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev. Assoc Paul Cir Dent*. 1982; 36(6):606-16.

Saldanha JB, Casati MZ, Neto FH, Sallum EA, Nociti Jr FH. Smoking may affect the alveolar process dimensions and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(9):1359-65.

Sanches MG. Influência da gestação sobre a cronologia dos processos de reparo em feridas de extração dental em ratas, Estudo histológico e bioquímico [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba;1983.

Santos, AA, Zanetta DMT, Cipullo JP, Burdmann EA. O diagnóstico da hipertensão arterial na criança e no adolescente. *Pediatria (São Paulo)* 2003;25(4):174-83.

Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, Tabchoury CM, Line SR. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and matrix metalloproteinases-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol*. 2001; 145(5):854-5.

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

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

Shalhoub V, Faust J, Boyle WJ, Dunstan CR, Kelley M, Kaufman S, et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclasts formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem*. 1999;72(2):251-61.

Silva HC, Colleta RD, Jorge J, Bolzani G, De Almeida OP, Graner E. The effect of cyclosporin A on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. *Arch Oral Biol*. 2001; 46(9):875-9.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89(2):309-19.

Simpson HE. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in *Macacus rhesus* monkeys. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv*. 1960; 18:391-9.

Simpson HE. The healing of extraction wounds. *Br Dent J*. 1969;126(12):550-7.

Smales RJ. Effects os sistemic cortisone on the healing of tooth socket in rats: a histologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;45(5):685-8.

Smith N. Extraction socket healing in the calcium deficient rat. *Austr Dent J*. 1975;20(1):22-6.

Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater*. 2000;16(2): 103-8.

Souza AP, Line SR. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002; 10(1):1-6.

Souza FA, Queiroz TP, Luvizuto ER, Nishioka RS, Garcia-Jr IR, Carvalho PSP, et al. Rank protein immunolabeling during bone-implant interface healing process. *Int J Dent*. No prelo 2010.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endoc Rev*. 1999;20(3):345-57.

Takeda K, Buñag RD. Chronic propranolol treatment inhibits sympathetic nerve activity and keeps blood pressure from rising in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1980; 2(2):228-35.

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

Tarazi RC, Grifford RWJR. Left ventricular hypertrophy and hypertension. *JAMA*. 1983; 250(10):1319.

Todo H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats I: initial cellular response to tooth extraction in rats studied with 3H thymidine. *Arch Oral Biol*. 1968;13(12):1421-7.

Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech* 2002; 58(2):77-84.

Togari A, Arai M. Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. *J Pharmacol Sci* 2008; 106(4): 542-6.

Togari A, Arai M, Kondo A. The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; 9(5): 931-40.

Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett*. 1997; 233(2-3):125-8.

Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141(9):3478-84.

Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(12):1048-58.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(2):103-11.

Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner*. 1993;20(3):251-64.

Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(11):1983-92.

Ye S, Mozayani P, Gamburd M, Zhong H, Campese VM. Interleukin-1 β and neurogenic control of blood pressure in normal rats and rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(6):H2786-96.

Yugosh LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J.* 2002; 13(2):92-6.

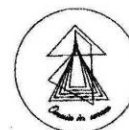
Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcif Tissue Int.* 2005; 76(2):136-45.

Zhao H, Cai G, Du J, Xia Z, Wang L, Zhu T Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in osteoporotic bone tissues. *J Tongji Med Univ.* 1997; 17(1):28-31.

Anexos

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEa)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ATENOLOL NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)"** sob responsabilidade da Profa Dra **CRISTINA ANTONIALI SILVA** e colaboração de **NATÁLIA MANRIQUE CURSINO** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEa em 29 de fevereiro de 2008, de acordo com o protocolo no. 2008-001397.

Araçatuba, 05 de março de 2008.

Profª Drª **CRISTINA ANTONIALI SILVA**
Presidente da CEEa - FOA/UNESP

ANEXO B – Artigo enviado para publicação (Revista JAOS – protocolo 1727).

ALVEOLAR BONE HEALING PROCESS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (SHR). A RADIOGRAPHIC DENSITOMETRY STUDY.

ABSTRACT

Hypertension is one of the most important public health issues in the world. When it is undiagnosed or untreated, this pathology represents a systemic risk factor and unfavorable conditions for dental treatments, especially treatments that require bone healing. Objectives: the purpose of this study was to demonstrate, by analysis of bone mineral density (BMD), that the alveolar bone healing process is altered in spontaneously hypertensive rats (SHRs). Materials and Methods: wistar rats and SHRs were submitted to extraction of the upper right incisor and sacrificed at 7, 14, 21, 28 and 42 days after surgery. Right maxillae were collected, radiographed and analyzed using Digora software. BMD was expressed as medium, low or high in the medium (MT) and apical (AT) thirds of the dental alveolus. Results: The results were compared across days and groups. Wistar showed difference in medium and low BMD in the MT between 7 and 28 and also between 14 and 28 days. The AT exhibited significant difference in medium and low BMD between 7 and 28 days, besides low BMD between 28 and 42 days. SHRs showed low BMD in the MT between 21 and 28 and between 28 and 42 days. Differences were observed across groups in medium and low BMD at day 28 in the MT and AT; and in high BMD at 14, 21 and 42 days in the MT. Conclusions: These results suggest that the alveolar bone healing process is delayed in SHRs comparing with Wistar rats.

Key words: Tooth Socket; Bone Density; Hypertension; SHR.

INTRODUCTION

The high prevalence of hypertension in the population and its implications make this disease a public health issue worldwide. Approximately fifty to sixty percent of the hypertensive patients are unaware of their condition and only ten percent of the dentist surgeons keep record of patients' blood pressure. Undiagnosed or untreated hypertension impairs some dental procedures, mainly those related to bone healing.

Local or systemic factors may contribute to alterations in the bone healing process. Systemic hypertension causes a series of damaging physiological alterations, depending on its intensity and duration²⁵; for instance, alteration in the calcium metabolism inducing bone loss. It is also known that medication taken by hypertensive patients may interfere in the alveolar bone healing process. Some authors demonstrated that amlodipine, a calcium channel antagonist, reduces bone formation in the dental alveolus of rats²⁶. Therefore, previous hypertension diagnosis and treatment are fundamental to obtain better results in oral rehabilitation with implant-supported prostheses that require substantial bone healing¹⁹.

The bone healing process following dental extraction has been extensively studied by histological and radiographic methods in humans^{8,22,27} as well as in animals^{10,18}. Radiography is the most commonly used method in clinical evaluation for being fast, non-invasive and inexpensive, permitting longitudinal analysis. The bone healing process is easily interpreted by a radiopacity increase, which can be measured by optical density analysis⁴.

Clinical protocols recommend that preventive maintenance visits be carried out every three months in hypertensive patients for a couple of years following osseointegrated implant placement, in order to reduce risks of long-term complications¹⁹. Early identification of defects during the osseointegration process may avoid or minimize peri-implant alveolar bone loss, increasing predictability and favoring treatment aesthetics¹⁶. According to van Steenberghe, et al.²⁸ high percentages of implant failures occur mainly in bone type IV, which presents discrete cortical component associated with trabecular bone exhibiting less mineralization and large medullary spaces. The specific characteristics of this bone type are similar to those found in bones of spontaneously hypertensive rats (SHRs)^{12,21,29}. The SHR is the closest experimental animal model to human essential hypertension. These animals are born normotensive and develop an increase in the blood pressure from the eighth week-old, reaching values close to 200 mmHg at twelve weeks old²⁴.

The purpose of this study was to demonstrate, by analysis of bone mineral density (BMD), that the alveolar bone healing process is altered in SHRs.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All experiments were approved by the Animal Research Ethics Committee (CEEa) at the School of Dentistry of Aracatuba (process number 2008-001397). Male SHR and normotensive Wistar rats weighing between 180 and 230g were used. The animals were kept in an artificially controlled environment with temperature ranging from 22 to 24° C, on a 12:12 hr light/dark cycle and were fed food and water *ad libitum*.

Experimental groups

Animals were divided into two experimental groups: 1) normotensive Wistar rats 2) SHRs. Each group was evaluated at five different times: 7, 14, 21, 28 and 42 days following tooth extraction. For each reading time we used five animals.

Blood pressure monitoring

The systolic arterial blood pressure (SBP) monitoring was performed by indirect tail cuff plethysmography, using a plethysmography device adapted for measurement in rats. Wistar rats and SHRs with SBP close or similar to 112 mmHg and similar or above 150 mmHg were used, respectively. The SBP was taken at preoperative and postoperative time periods (7, 14, 21, 28, 42 days).

Surgery

Animals were anesthetized by administration of a solution of ketamine chloride (50 mg/kg i.m., Dopalen®, Vetbrands/10mL, Jacaré - SP, Brazil) and xylazine chloride (10mg/kg, i.m., Coopazine®, Coopers Brasil LTDA/10 mL, São Paulo - SP, Brazil). Antisepsis of the anterior portion of the maxilla was performed using iodized polyvinylpyrrolidone and extraction of the upper right incisor was done using specially adapted tools, according to the technique described by Okamoto and de Russo²⁰. The tooth luxation was carried out using a Hollemback instrument adapted to insert its active end between the tooth and the medial cortical border where lateral movements were performed following tooth extraction using adapted orthodontic pliers. The margins of the surgical wounds were sutured with sterile surgical wires (Vicryl® 5-0 – Ethycon, São Paulo - SP, Brazil). After surgery each animal received a single 0.2 ml intramuscular dose of antibiotic (1.7g/3mL Veterinary Pentabiotic, Fort DODGE, Campinas - SP, Brazil). During two postoperative days, animals were fed ground rat chow to facilitate feeding (minimize both trauma at surgical site and healing process delay). After this period, standard lab block food was reintroduced.

Sample collection

Animals were euthanized at 7, 14, 21, 28 and 42 days after surgery in chamber saturated with halothane vapor. Next, the upper right maxilla was separated from the left part by means of median sagittal incision following the intermaxillary suture. Alveolar bone samples were obtained through tangential cuts to the molar distal faces using surgical scissors. Immediately after collection, the samples were immersed in 10% buffered formalin solution (pH 7.0) for 48 h for tissue structure preservation. All soft tissue around the samples as well as the zygomatic arch was removed to avoid possible interference in the radiography.

Densitometric analysis of the dental alveolus

Radiographs were taken 24 hours after sample collection. To obtain radiographic images, an X GE-100 (General Electric, WI, USA), operating at 50kvp, 10mA, 0.166 s was used. The distance focus-film was 40cm, with perpendicular incidence to the film-object plane.

Direct digital image was obtained with optical plate from the digital system Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Over each optical plate, one sample was placed and identified with lead letters and numbers. One image was obtained for each sample per animal of each experimental group at the different postoperative periods.

The sensitized optical plates were scanned and analyzed using Digora for Windows 1.51 software. This software provides, among other resources, the analysis of radiographic density (bone mineral density, BMD) by means of its gray levels.

Areas of specific sizes, visible in all digitalized images, were selected for densitometric analysis. In the medium third, the area analyzed was 46x18 pi (pixels) and in the apical third 20x20 pi. Low, high and medium densities were expressed as grey level values. One measurement in each area per image was done corresponding to the BMD of the area.

Statistical analysis

The data were expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM) and analyzed by two-way ANOVA and Tukey post test. Significance level among postoperative days and between groups was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Systolic Blood Pressure (SBP)

The SBP was taken before surgery and at 7, 14, 21, 28 and 42 days after surgery. The SBP of SHR was higher ($p < 0.05$) than of Wistar rats in all analyzed periods (Figure 1).

BMD analysis of the alveolar bone healing

Wistar rats showed significant increase in medium and high BMD in the medium third of the dental alveolus on day 28 when compared with days 7 and 14 postoperatively; while low BMD values showed no significant difference (Table 1). The apical third of the dental alveolus exhibited significant increase in medium and low BMD on day 28 when compared with day 7, as well as significant reduction in low BMD on day 42 when compared with day 28 (Table 2).

SHRs exhibited significant decrease in medium and low BMD in the medium third of the alveolus on day 28 when compared with day 21 post surgery (Table 1). On the other hand, a significant increase in medium and low BMD was noted at 42 days when compared with 28 days; while no difference in high BMD values was noted. The apical third exhibited no significant alteration.

Intergroup comparison revealed a significant decrease in medium and low BMD at 28 days in both thirds of the alveolus of SHRs. In addition, high BMD values increased in the medium third in the alveolus of SHRs at 14, 21 and 42 days. However, these increased high BMD values did not alter the medium BMD measurements, since the medium BMD values of the periods mentioned in SHRs were not different from those observed in Wistar rats.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study demonstrated for the first time that the alveolar dental healing is altered in SHRs, when compared with normotensive Wistar rats. The results suggest that hypertension delays alveolar bone healing.

It has been widely accepted that the most appropriate control strain to SHR studies is the Wistar-Kyoto (WKY) rat, to which SHRs are genetically related. Concerns have been raised about genetic differences⁷ and biological variability¹⁴ between SHRs and WKY rats. Moreover, evidences suggest that the WKY strain is not the most suitable for backcross studies because of the incidence of spontaneous hypertension and the somewhat higher levels of blood pressure in these rats^{1,2,17,23}. According to several studies^{3,9,13,15}, SHRs were compared to Wistar rats, which are safely normotensive and with no genetic alteration that could modulate arterial pressure.

Densitometric analysis showed that an expected gradual BMD increase was not observed in relation to the sequence of postoperative days in normotensive rats; however a significant BMD increase at 28 days was observed in the medium and apical thirds of the dental alveolus. These results suggest that there is significant bone formation at 28 days of the healing process. Guglielmotti and Cabrini¹¹ also analyzed the alveolar bone healing in Wistar rats, based on histometric parameters including volume density of bone; however, in a restricted area of the apical third. Although no statistical analysis was performed in the study

mentioned, high radiographic density was observed all over the healing extension, leaving the alveolus walls undistinguishable around day 30 post surgery.

The present data can be corroborated by histometric studies that observed no difference in the quantity of bone tissue formed in the dental alveolus of Wistar rats one, two and three weeks after surgery³⁰ and continuous osseous neoformation was also observed over 21 days after surgery⁶. In our study, a reduction in low BMD was observed at 42 days in relation to 28 days in the apical third of the alveolus of Wistar rats, with no alteration of high BMD values. These data suggest that the reduction of medullary spaces between the trabeculae can be associated with the formation of a more compact bone tissue, as demonstrated in a previous histological study that evaluated the alveolar healing process at 42 days after tooth extraction in Wistar rats⁶.

In the alveolus of SHRs, the reduction in medium and low BMD in the dental alveolus at 28 days in relation to 21 days, with subsequent increase at 42 days, demonstrated that the healing process did not follow the same pattern observed in Wistar rats. The decrease in medium BMD at 28 days in SHRs revealed a reduced quantity of bone tissue or a less mineralized bone tissue. Alveolar healing process alteration, characterized by immature bone tissue, was also noted between 9 and 21 days after upper incisive tooth extraction using a renal hypertensive (Goldblatt rats 1-kidney, 1-clip) animal model⁵. Histological evaluations of the healing process in femur defects induced in SHRs showed a prevalence of flattened osteoblasts in the periphery of bone trabeculae, characterizing their quiescent aspect²¹. Our results concerning alveolar bone healing are in agreement with previous studies that showed alveolar bone disorders in SHRs during ligature-induced periodontal disease, when compared to normotensive Wistar rats. It was demonstrated an exacerbated response to periodontal disease¹⁵ with an increased bone resorption and decreased bone density in SHRs³.

CONCLUSION

Our results demonstrate that BMD in the dental alveolus of spontaneously hypertensive rats is significantly decreased at 28 days after tooth extraction, strongly suggesting a delay of the alveolar healing under this pathological condition. Further investigations should be carried out in order to determine the mechanisms involved in the alveolar healing process in this spontaneously hypertensive animal model.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation - FAPESP (Proc no. 2008/01893-0) and also CAPES and UNESP Research Internationalization Program (PROINTER/PROPe – UNESP) for the financial support.

REFERENCES

1. ALEXANDER D, GARDNER JP, TOMONARI H, FINE BP, AVIV A. Lower Na(+)-H+ antiport activity in vascular smooth muscle cells of Wistar-Kyoto rats than spontaneously hypertensive and Wistar rats. *J Hypertension* 1990; 8: 867-871.
2. ASHIDA T, KURAMOCHI M, OMAE T. Increased sodium-calcium exchange in arterial smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1989; 13: 890-895.
3. BASTOS MF, BRILHANTE FV, GONÇALVES TE, GONÇALVES PIRES A, HENRIQUE NAMIPOGA M, ROCHA MARQUES M, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: A study in rats. *J Periodontol* 2010; 29: in press.
4. BODNER L, KAFFE I, LITTNER MM, COHEN J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 75: 367-372.
5. CARVALHO AA, DE CASTRO AL, MELHADO RM, BEDRAN DE CASTRO JC. Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension. A histological study. *J Nihon Univ Sch Dent* 1983; 25: 214-220.
6. CARVALHO TL, BOMBONATO KF, BRENTGANI LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J* 1997; 8: 9-12.
7. CHARCHAR FJ, KAISER M, BINGHAM AJ, FOTINATOS N, AHMADY F, TOMASZEWSKI M, et al. Whole genome survey of copy number variation in the spontaneously hypertensive rat: relationship to quantitative trait loci, gene expression, and blood pressure. *Hypertension* 2010; 55: 1231-1238.
8. CRESPI R, CAPPARÈ P, GHERLONE E. Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *J Periodontol* 2009; 80: 210-218.
9. ELIAS GP, SASSAKI KT, DELBEM AC, ANTONIALI C. Atenolol reduces salivary activity in pups of spontaneously hypertensive and normotensive rats treated during pregnancy and lactation. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30: 133-141.

10. GORUSTOVICH AA, STEIMETZ T, NIELSEN FH, GUGLIELMOTTI MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec* 2008; 291: 441-447.
11. GUGLIELMOTTI MB, CABRINI RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43: 359-364.
12. IZAWA Y, SAGARA K, KADOTA T, MAKITA T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 605-607.
13. KRISTEK F, KOPRDOVÁ R, CEBOVÁ M. Long-term effects of early administered sildenafil and NO donor on the cardiovascular system of SHR. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 33-43.
14. KURTZ TW, MORRIS RC JR. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1987; 10: 127-131.
15. LEITE CL, REDINS CA, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hyperten* 2005; 6: 523-531.
16. LEVIN L. Dealing with dental implant failures. *J Appl Oral Sci* 2008;16: 171-175.
17. LOUIS WJ, HOWES LG. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16: S1- S5.
18. MENDES RM, SILVA GA, LIMA MF, CALLIARI MV, ALMEIDA AP, ALVES JB, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1155-1162.
19. MISCH CE. Medical evaluation of the implant patient . In: MISCH CE. *Contemporary implant dentistry*. St. Louis: Mosby; 1999. p. 33-65.

20. OKAMOTO T, DE RUSSO MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1973; 2: 153-169.
21. PEREIRA AC, AMADEI SU, SILVEIRA VAS, BALDUCCI I, FAIG-LEITE H. Estudo comparativo da porcentagem das áreas cortical, trabecular e do canal medular do fêmur de ratos hipertensos (SHR) e normotensos. *Cienc Odontol Bras* 2007; 10: 64-69.
22. SALDANHA JB, CASATI MZ, NETO FH, SALLUM EA, NOCITI FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimensions and radiographic bone density in maxillary extraction sites: A prospective study in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 1359-1365.
23. SATO T, ARAI M, GOTO S, TOGARI A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 19: in press.
24. SUGIYAMA T, YOSHIZUMI M, TAKAKU F, URABE H, TSUKAKOSHI M, KASUYA T, et al. The elevation of the cytoplasmic calcium ions in vascular smooth muscle cells in SHR- measurement of the free calcium ions in single living cells by lasermicrofluorospectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 141: 340-345.
25. TARAIZI RC, GIFFORD RW JR. Left ventricular hypertrophy and hypertension. *JAMA* 1983; 250:1319.
26. TEÓFILO JM, BRENTAGANI LG, CARVALHO TL. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Arch Oral Biol* 2001;46: 375-379.
27. VAN DER WEIJDEN F, DELL'ACQUA F, SLOT DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 1048-1058.
28. VAN STEENBERGHE D, JACOBS R, DESNYDER M, MAFFEI G, QUIRYNEN M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Impl Res* 2002;13: 617-622.

29. WANG TM, HSU JF, JEE WS, MATTHEWS JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* 1993; 20: 251-264.
30. YUGOSHI LI, SALA MA, BRENTGANI LG, LAMANO CARVALHO TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J* 2002; 13: 92-96.

LEGEND FOR FIGURE

Figure 1. Systolic Arterial Blood Pressure (SBP) of Wistar rats (closed circles, n=5) and SHRs (open circles, n=5). Symbols represent means $\pm$ SEM of the experiments performed.

FIGURE 1

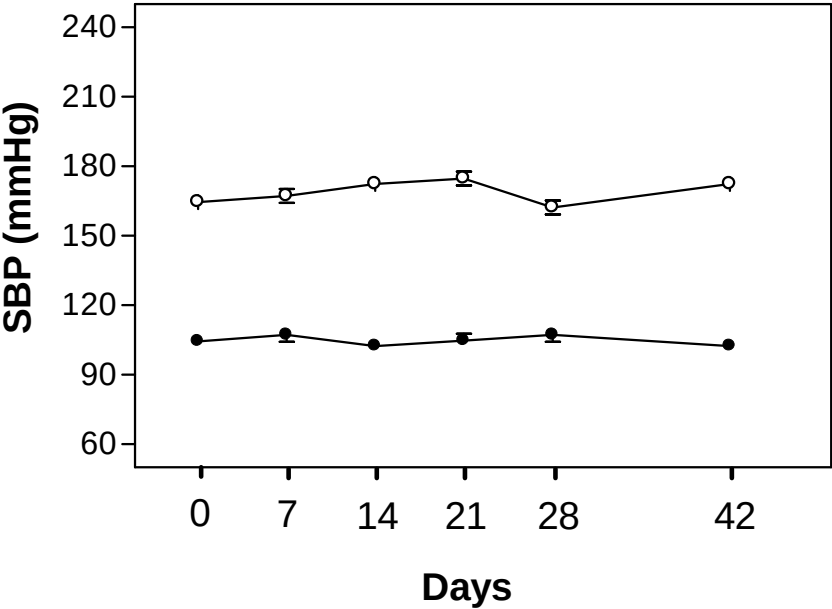


Table 1. Bone Mineral Density (BMD) values (mean $\pm$ SEM) of the medium third of Wistar rats and SHR.

Day	Medium BMD		Low BMD		High BMD	
	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR
7	159 $\pm$ 0.9bA	164 $\pm$ 4.9abA	146.4 $\pm$ 1.4aA	153.2 $\pm$ 5.4abA	176.4 $\pm$ 2.1bA	180.4 $\pm$ 4.1aA
14	160.2 $\pm$ 4.4bA	166.1 $\pm$ 2.5abA	146.2 $\pm$ 4.9aA	149.6 $\pm$ 3.7abA	175.4 $\pm$ 2.9bB	182.6 $\pm$ 1.1aA
21	164.6 $\pm$ 1.3abA	171.2 $\pm$ 0.8aA	151 $\pm$ 1.5aA	155 $\pm$ 1.2aA	180 $\pm$ 1.9abB	188.2 $\pm$ 1.2aA
28	171.3 $\pm$ 1.5aB	159.4 $\pm$ 1.8bA	155.6 $\pm$ 1.5aA	142.4 $\pm$ 2.2bB	187 $\pm$ 2.6aA	181.6 $\pm$ 1.4aA
42	163.4 $\pm$ 1.3abA	170.6 $\pm$ 2.7aA	148.0 $\pm$ 1.4aA	152.2 $\pm$ 2.8abA	181.2 $\pm$ 1.8abB	189.6 $\pm$ 2.4aA

Mean values followed by distinct letters, lowercase for columns and capitals for lines, showing significant differences by Tukey test ($p < 0.05$).

Table 2. Bone Mineral Density (BMD) values (mean $\pm$ SEM) of the apical third of Wistar rats and SHR.

Day	Medium BMD		Low BMD		High BMD	
	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR	WISTAR	SHR
7	165 $\pm$ 1.8bA	166 $\pm$ 4.7aA	150.6 $\pm$ 3.3bA	151.4 $\pm$ 5.1aA	182.4 $\pm$ 3.8aA	181 $\pm$ 4.5aA
14	166.4 $\pm$ 5.2abA	165.6 $\pm$ 3.9aA	151.6 $\pm$ 7.2abA	149.6 $\pm$ 4.7aA	179.6 $\pm$ 5aA	182.6 $\pm$ 4.1aA
21	172.8 $\pm$ 2.3abA	172.9 $\pm$ 0.8aA	160 $\pm$ 2.8abA	156 $\pm$ 1.8aA	186.4 $\pm$ 2.2aA	192.2 $\pm$ 1.8aA
28	178.4 $\pm$ 2.3aA	161 $\pm$ 2.2aB	166.8 $\pm$ 1.8aA	145.8 $\pm$ 2.8aB	189.2 $\pm$ 2.7aA	178 $\pm$ 3.2aA
42	168.7 $\pm$ 2abA	173 $\pm$ 4.2aA	149.8 $\pm$ 2.6bA	159 $\pm$ 4.6aA	189.2 $\pm$ 2.7aA	188 $\pm$ 4.8aA

Mean values followed by distinct letters, lowercase for columns and capitals for lines, showing significant differences by Tukey test ($p < 0.05$).

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](#)