VERÓNICA KEI LEN CHIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM
DEFEITOS BICORTICAIS NO ÂNGULO DE MANDÍBULA
DE RATOS GENETICAMENTE HIPERTENSOS
E DE SEUS CONTROLES WISTAR-KYOTO**

São Paulo

2008

Verónica Kei Len Chin

**Avaliação histológica da reparação óssea em
defeitos bicorticais no ângulo de mandíbula
de ratos geneticamente hipertensos
e de seus controles Wistar-Kyoto**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientadora: Profa. Associada Maria da Graça Naclério-Homem

São Paulo

2008

Chin VKL. Avaliação histológica da reparação óssea em defeitos bicorticais no ângulo de mandíbula de ratos geneticamente hipertensos e de seus controles Wistar-Kyoto [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, 01 / 10 / 2008.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Tai Can e Gut Kheu, e ao meu irmão Daniel, meus grandes heróis.

À minha segunda chance de viver.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Professora Associada Maria da Graça Naclério-Homem pela ativa participação durante a tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Titular Antonio Carlos de Campos pelo incentivo e exemplo de dedicação à docência.

A amiga Profa. Dra. Adriana Shinagawa, pela ajuda essencial nesta tese e em todos os trabalhos acadêmicos.

Às colegas Cirurgiã-Dentista Juliana Yuki Hayashi, Mestre Alessandra Kyanitza Dantas e Cirurgiã-Dentista Aline Thaís Luciano Barbosa pela amizade durante o curso de pós-graduação.

À Elisa dos Santos e Beatriz Costa, do Laboratório de Patologia Bucal do departamento de Patologia pelo trabalho técnico histológico.

Aos Mestres Luciana Neves Torres, Médica do Serviço de Patologia Animal, e Daniel Soares Sanches, da Faculdade de Medicina Veterinária, pela interpretação e obtenção das imagens histológicas.

A Ângela de Andrade, Aparecida Conceicao de Souza, Natália da Conceicao Afonso, Roseli de Andrade e Edison Henrique Vicente pelo apoio acadêmico durante o curso de pós-graduação.

Ao Professor Doutor José Luiz Piratininga, à Professora Doutora Maria Cristina Zindel Deboni e à Doutora Vera Regina Pereira Pozzani pelos contínuos ensinamentos.

À Fapesp pela concessão do Auxílio à Pesquisa nº 05/55009-6.

Só aspira a normalidade o medíocre.

Jung

Chin VKL. Avaliação histológica da reparação óssea em defeitos bicorticais no ângulo de mandíbula de ratos geneticamente hipertensos e de seus controles Wistar-Kyoto [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

A presença da hipertensão arterial pode comprometer a qualidade da reparação óssea, pois a doença é caracterizada por alterações fisiopatológicas vasculares e do metabolismo mineral. Com o objetivo de avaliar a neoformação e o remodelamento ósseo, este trabalho investigou o processo da reparação óssea em ratos geneticamente hipertensos (SHR) e de seus controles Wistar-Kyoto (WKY). Defeitos bicorticais de 2mm de diâmetro no lado direito e de 5mm no lado esquerdo, foram realizados com trefinas na região do ângulo de mandíbula. Os animais, divididos em grupos de cinco indivíduos cada, foram sacrificados após 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios; as mandíbulas foram removidas, fixadas em formol a 10%, descalcificadas em ácido fórmico a 20%, incluídas em parafina e as secções histológicas, de 7µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas com aumento de 40x e a área do defeito mensurada pelo programa de histometria digital Image J versão 1.4. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa na comparação entre as linhagens WKY e SHR ($p = 0,884$), independente dos períodos ou lados avaliados; entre períodos, nas linhagens WKY ($p = 0,101$) e SHR ($p = 0,479$), independente dos lados avaliados; entre períodos por linhagens no lado direito; e entre linhagens por lados, esquerdo com $p = 0,466$ e direito com $p = 0,689$, independente do fator período. Houve diferença estatisticamente significativa entre o lado esquerdo e o direito ($p < 0,001$),

independente das linhagens e períodos avaliados; entre os lados por linhagens, WKY e SHR, ambas com $p < 0,001$; entre períodos por linhagens no lado esquerdo, no qual o grupo WKY de 15 dias apresentou área menor que o grupo WKY de 60 dias e o grupo SHR de 10 dias, e o grupo WKY de 60 dias apresentou área maior que o grupo SHR de 30 dias e SHR de 60 dias. Apesar das alterações encontradas no lado esquerdo, que podem ser atribuídas à remodelação funcional do osso da mandíbula, não houve diferenças significantes na reparação do defeito de 5mm e de 2mm entre ratos espontaneamente hipertensos e de seus controles Wistar-Kyoto.

Palavras-Chave: Histologia – Mandíbula – Ratos endogâmicos SHR – Ratos endogâmicos WKY – Regeneração óssea

Chin VKL. Histological evaluation of bone repair in through-in-through defects of mandibular angle of the spontaneously hypertensive rats and controls Wistar-Kyoto [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Arterial hypertension may affect the quality of bone repair because this disease is characterized by physiopathological vascular and bone metabolism changes. With the objective of evaluating the bone neoformation and remodeling, this study investigated the process of bone repair in spontaneously hypertensive rats (SHR) and their match controls Wistar-Kyoto (WKY). Through-in-through defects were done with trephine burs in the mandibular angle area, of 2mm diameter on the right side and 5mm diameter on the left side. The animals were divided into groups of five individuals each one and killed after 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 and 90 postoperative days; the mandibles were removed, fixed in 10% formalin solution, decalcified with 20% formic acid, and embedded in paraffin; the histological sections of 7 μ m thickness were stained with hematoxylin and eosin. The images were captured with 40x magnification and the defect area was measured by the image processing program Image J version 1.4. The statistical analysis showed that there is no significant difference in the comparison of WKY and SHR strains ($p = 0,884$), independent of periods or sides; among periods, in the WKY strain ($p = 0,101$) and SHR one ($p = 0,479$), independent of sides; among periods by strains on the right side; and among strains by sides, left side with $p = 0,466$ and right side with $p = 0,689$, independent of periods. There is a significant difference between left and right side ($p < 0,001$), independent of strains and periods; between sides by strains, WKY

and SHR, both with $p < 0,001$; among periods by strains on the left side, which WKY 15 days group showed an area smaller than WKY 60 days and SHR 10 days groups, and WKY 60 days group showed an area bigger than SHR 30 days and SHR 60 days groups. Despite the changes founded on the left side that could be attributed to the functional remodeling of the mandibular bone, there were no differences in the bone repair of 5mm and 2mm diameter defects between spontaneously hypertensive rats and their match controls Wistar-Kyoto.

Keywords: Histology – Mandible – Bone regeneration – Rats, Inbred SHR – Rats, Inbred WKY – Bone regeneration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Campo cirúrgico.....	30
Figura 4.2 – Divulsão do músculo masseter	30
Figura 4.3 – Confecção do defeito cirúrgico.....	31
Figura 4.4 – Defeito de 2mm no lado direito	31
Figura 4.5 – Defeito de 5mm no lado esquerdo	32
Figura 4.6 – Pós-cirúrgico imediato	32
Figura 4.7 – Imagem obtida no microscópio	34
Figura 4.8 – Delimitação do campo central do defeito	34
Figura 4.9 – Mensuração da área no programa Image J	35
Figura 5.1 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 2 dias	38
Figura 5.2 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 3 dias	39
Figura 5.3 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 5 dias	40
Figura 5.4 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 10 dias	41
Figura 5.5 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 30 dias	42
Figura 5.6 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 60 dias	43
Figura 5.7 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 90 dias	44
Figura 5.8 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 2 dias.....	45
Figura 5.9 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 3 dias.....	46
Figura 5.10 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 10 dias.....	47
Figura 5.11 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 15 dias.....	48
Figura 5.12 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 30 dias.....	49
Figura 5.13 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 60 dias.....	50

Figura 5.14 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 90 dias.....	51
Figura 5.15 – WKY de 2 dias, lado esquerdo.....	53
Figura 5.16 – WKY de 2 dias, lado direito.....	53
Figura 5.17 – SHR de 2 dias, lado esquerdo	53
Figura 5.18 – SHR de 2 dias, lado direito	53
Figura 5.19 – WKY de 3 dias, lado esquerdo.....	54
Figura 5.20 – WKY de 3 dias, lado direito.....	54
Figura 5.21 – SHR de 3 dias, lado esquerdo	54
Figura 5.22 – SHR de 3 dias, lado direito	54
Figura 5.23 – WKY de 5 dias, lado esquerdo.....	55
Figura 5.24 – WKY de 5 dias, lado direito.....	55
Figura 5.25 – SHR de 5 dias, lado esquerdo	56
Figura 5.26 – SHR de 5 dias, lado direito	56
Figura 5.27 – WKY de 10 dias, lado esquerdo.....	57
Figura 5.28 – WKY de 10 dias, lado direito.....	57
Figura 5.29 – SHR de 10 dias, lado esquerdo	57
Figura 5.30 – SHR de 10 dias, lado direito	57
Figura 5.31 – WKY de 15 dias, lado esquerdo.....	58
Figura 5.32 – WKY de 15 dias, lado direito.....	58
Figura 5.33 – SHR de 15 dias, lado esquerdo	58
Figura 5.34 – SHR de 15 dias, lado direito	58
Figura 5.35 – WKY de 30 dias, lado esquerdo.....	59
Figura 5.36 – WKY de 30 dias, lado direito.....	59
Figura 5.37 – SHR de 30 dias, lado esquerdo	59
Figura 5.38 – SHR de 30 dias, lado direito	59

Figura 5.39 – WKY de 60 dias, lado esquerdo.....	60
Figura 5.40 – WKY de 60 dias, lado direito.....	60
Figura 5.41 – WKY de 90 dias, lado esquerdo.....	60
Figura 5.42 – WKY de 90 dias, lado direito.....	60
Figura 5.43 – SHR de 60 dias, lado esquerdo	61
Figura 5.44 – SHR de 60 dias, lado direito	61
Figura 5.45 – SHR de 90 dias, lado esquerdo	61
Figura 5.46 – SHR de 90 dias, lado direito	61
Gráfico 5.1 – Evolução das médias gerais das linhagens segundo os períodos	63
Gráfico 5.2 – Evolução das médias por lado segundo os períodos.....	64
Gráfico 5.3 – Comparação dos lados na linhagem WKY	65
Gráfico 5.4 – Comparação dos lados na linhagem SHR	65

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Pressão Arterial	18
2.2 Hipertensão e Osso	21
2.3 Hipertensão na Reparação Óssea.....	23
2.4 Ratos Espontaneamente Hipertensos	24
3 PROPOSIÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Material	27
4.2 Métodos.....	29
5 RESULTADOS	36
5.1 Aspecto macroscópico	37
5.2 Achados histológicos	52
5.2.1 Período de 2 dias.....	53
5.2.2 Período de 3 dias.....	54
5.2.3 Período de 5 dias.....	55
5.2.4 Período de 10 dias.....	57
5.2.5 Período de 15 dias.....	58
5.2.6 Período de 30 dias.....	59
5.2.7 Período de 60 e 90 dias.....	60
5.3 Análise estatística	62

6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma das doenças mais comuns na população humana. No Brasil há quase 17 milhões de portadores, atingindo 35% dos indivíduos na faixa etária acima dos 40 anos. Esses números poderão ser maiores, pois estima-se que 4% das crianças e adolescentes também sejam hipertensos (BRASIL, 2006).

Por ser uma doença assintomática na maior parte do seu curso, o diagnóstico e o tratamento são freqüentemente negligenciados, além de haver falta de interesse dos pacientes quanto ao controle da hipertensão. Um levantamento realizado no ambulatório de Cirurgia Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, revelou que mais da metade dos hipertensos, ainda que medicados, apresentavam níveis pressóricos acima do considerado aceitável (MORLIN et al., 2005).

Antes que o aumento da pressão seja clinicamente detectável, alterações fisiopatológicas já ocorreram no sistema hormonal, notadamente da renina-angiotensina, e no sistema circulatório, caracterizado por aumento da resistência periférica decorrente do espessamento da parede de pequenas artérias e arteríolas pré-capilares, rarefação microvascular, disfunção endotelial e angiogênese diminuída (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; BOBIK, 2005).

A influência da hipertensão no metabolismo ósseo em humanos é conflitante. Há relatos díspares do aumento ou não na excreção urinária de cálcio, nível sérico de cálcio total e de cálcio ionizado, densidade mineral óssea e conteúdo mineral ósseo, e no nível sérico de vitamina D (AFGHANI; JOHNSON, 2006; GOTOH et al., 2005; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; YOUNG et al., 1995).

Pesquisas envolvendo ratos espontaneamente hipertensos (SHR) vêm apresentando mais informações sobre a hipertensão primária em humanos e sua influência no metabolismo ósseo. A linhagem SHR foi obtida por Okamoto e Aoki (1963), a partir do cruzamento de ratos Wistar-Kyoto (WKY) que apresentavam pressão diastólica superior a 150mmHg. Em cada geração, o aumento na pressão se manifestava em um número maior de indivíduos e em menor idade, atingindo 100% em 15 semanas na sexta geração.

Assim, considerando as alterações microvasculares e do metabolismo mineral na hipertensão arterial, e a escassez da literatura sobre o tema, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação histológica e histométrica da neoformação e remodelação ósseas em defeitos bicorticais confeccionados no ângulo da mandíbula de ratos SHR, comparando os resultados com os obtidos dos controles WKY.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pressão Arterial

A evolução da vida de unicelular para a pluricelular exigiu, entre outras adaptações, a criação de estruturas e funções para o transporte de substâncias. Nas aves e mamíferos, este sistema atinge o ápice de eficiência circulatória: artérias distribuindo sangue oxigenado e nutrientes, e veias coletando sangue venoso e metabólitos, dinâmica esta mantida pelo funcionamento do coração (GUYTON, 2002).

Na circulação pulmonar, ou pequena circulação, o sangue venoso passa pelo tronco da artéria pulmonar no átrio direito do coração, segue até o pulmão e retorna pelas veias pulmonares no átrio esquerdo, que desemboca no ventrículo esquerdo. Na circulação sistêmica, ou grande circulação, o percurso do sangue arterial inicia na artéria aorta, segue por vasos arteriais de calibres progressivamente menores até os capilares que se unem com os vasos venosos pelas vênulas, e chega à veia cava inferior e à veia cava superior, no átrio direito (GUYTON, 2002; KASSAB, 2006).

Durante a sístole, com pressão normal em 120mmHg, o sangue é ejetado do ventrículo esquerdo para a artéria aorta e do ventrículo direito para a artéria pulmonar. O fluxo inicialmente pulsátil se torna contínuo e ao longo das artérias sistêmicas a pressão cai de 80 para 40mmHg antes das arteríolas, para aproximadamente 35mmHg nos capilares e para 10mmHg nas vênulas (GUYTON, 2002).

As arteríolas são dotadas de anéis de músculo liso que constituem os esfíncteres localizados na entrada dos capilares, determinando o momento e a quantidade de sangue no leito capilar em resposta a estímulos físicos e químicos. Dessa forma, as arteríolas são consideradas os vasos de maior resistência e responsáveis em manter a perfusão adequada dos tecidos (GUYTON, 2002).

O aumento da espessura das paredes e a redução da luz dos vasos são freqüentemente observados nas arteríolas pequenas e nas pré-capilares. Na região bucal, Castelli et al. (1978) verificaram em ratos com hipertensão renal induzida, que as arteríolas gengivais exibiam proliferação da camada íntima e elástica, hialinização das paredes, e redução da luz dos vasos. Alterações similares, porém menos freqüentes, foram observadas nos vasos nutrícios do ligamento periodontal, enquanto as arteríolas alveolares e pulpares estavam inalteradas.

Esta elevação da resistência periférica e o débito cardíaco normal caracterizam a hipertensão primária ou essencial (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; BOBIK, 2005), em que a pressão sistólica é maior ou igual a 140mmHg e a pressão diastólica é maior ou igual a 90mmHg (BRASIL, 2006). É uma doença de início assintomática, e seu diagnóstico e tratamento são freqüentemente negligenciados pelos pacientes (MORLIN et al., 2005).

Entre os mecanismos hormonais de maior importância no controle da pressão arterial está o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Uma queda na pressão estimula a liberação da enzima renina pelos rins que cliva o angiotensinogênio (AGT), produzido pelo fígado, em angiotensina I (Ang I); pela ação da assim denominada enzima conversora da angiotensina (ECA), a Ang I é clivada em angiotensina II (Ang II), peptídeo com efetiva ação vasoconstritora. Além disso, a Ang II estimula a liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, aumentando a

excreção de potássio e a retenção de sódio, e com este a água (CAREY; SIRAGY, 2003; ERDOS; SKIDGEL, 1987; HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001).

A Ang II regula a pressão arterial por um mecanismo direto ao se ligar a receptores tipo 1 (AT1), presentes nas células dos músculos lisos das arteríolas pré-capilares e vênulas pós-capilares, provocando vasoconstrição e proliferação celular. Uma vez ativado, o receptor AT1 também promove o aumento da formação de matriz extracelular e de espécies reativas de oxigênio. Pelo mecanismo indireto, a Ang II estimula a liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos e sua produção nas glândulas adrenais. Há também os receptores tipo 2 (AT2), nos quais os efeitos são em geral antagônicas (DINH et al., 2001; HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; INAGAMI et al., 1999).

Tanto os genes codificadores de AGT quanto os de ECA podem apresentar polimorfismos que alteram, respectivamente, a quantidade e a atividade de cada um. O gene codificador do AGT localiza-se no cromossomo 1 e pode apresentar um alelo mutante que aumenta a velocidade de transcrição do DNA e, conseqüentemente, a produção de AGT. A presença dessa mutação é confirmada pela presença de AGT com aminoácido tirosina no ponto 235 (T235), ao invés do aminoácido metionina (M235). Assim, indivíduos homozigotos T235 apresentam níveis de AGT 20% superiores quando comparados aos indivíduos homozigotos M235, enquanto os indivíduos heterozigotos M235/T235 têm níveis intermediários (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; JEUNEMAITRE et al., 1992).

Para o gene codificador da ECA, um dos polimorfismos mais estudados é a deleção ou alelo curto (D) e a inserção ou alelo longo (I), um fragmento de DNA com aproximadamente 250 pares de bases, no íntron 16 do cromossomo 17. Esse polimorfismo responde por 47% da variação nos níveis séricos da ECA, no qual

indivíduos com genótipo DD, dois alelos curtos, apresentam aproximadamente o dobro de atividade enzimática da observada nos indivíduos II, dois alelos longos, enquanto os indivíduos ID, um alelo longo e um alelo curto, apresentam um valor intermediário (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; RIGAT et al., 1990).

Há indícios de outros genes envolvidos e é necessário mais do que a herança genética para determinar o surgimento da hipertensão primária em um indivíduo. O estabelecimento e a progressão silenciosos da doença resultam em alterações fisiopatológicas que interferem na homeostasia, entre as quais, do metabolismo ósseo.

2.2 Hipertensão e Osso

A observação de possíveis alterações ósseas decorrentes do aumento da pressão arterial iniciou-se com a visualização da presença de um número maior de canais nutritivos em radiografias periapicais feita por Patel e Wuehrmann (1976). Posteriormente, os recursos imaginológicos evoluíram para a utilização da densitometria óssea, definindo um meio de comparação menos impreciso entre os estudos. Contudo, estas avaliações ainda são escassas.

Os trabalhos encontrados se referem a mulheres hipertensas na pós-menopausa. Há relatos de correlação entre aumento da pressão sistólica e redução da densidade mineral óssea (DMO) da espinha lombar (GOTOH et al., 2005; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001), como também da ausência dessas diferenças (PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003a).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) é menor em mulheres hipertensas na pré-menopausa com sobrepeso ou obesas não-medicadas (AFGHANI; JONHSON, 2006), e também em crianças e adolescentes hipertensos com sobrepeso; no gênero masculino há correlação negativa com a pressão sistólica, tornando-se mais forte após a puberdade (AFGHANI; GORAN, 2007).

Mulheres com genótipo II da ECA apresentam níveis mais elevados de hormônio paratireoidiano, maior DMO, concentração sérica e excreção urinária de cálcio, quando comparadas com mulheres genótipo ID e DD, sem haver distinção quanto ao tipo de tratamento anti-hipertensivo ou medidas pressóricas. Entre mulheres com genótipo DD da ECA, 36% apresentam osteoporose (PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003b).

Com relação ao nível sérico de cálcio total, não há relatos de diferenças (GOTOH et al., 2005; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; YOUNG et al., 1995). O nível sérico de cálcio ionizado também pode não apresentar diferenças (TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; YOUNG et al., 1995), como estar diminuído nas mulheres hipertensas (GOTOH et al., 2005). A calciúria parece ser maior nas mulheres hipertensas na pós-menopausa (TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; GOTOH et al., 2005), como também não estar alterada (YOUNG et al., 1995).

O nível sérico de vitamina D pode não apresentar diferenças (TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; YOUNG et al., 1995), como ser maior nas mulheres hipertensas (GOTOH et al., 2005). O nível plasmático de paratormônio é maior nas mulheres hipertensas (GOTOH et al., 2005; YOUNG et al., 1995).

Se os dados são conflitantes em mulheres, nos homens os dados são escassos. Jankowska et al. (2002) encontraram correlação negativa apenas entre pressão diastólica e CMO no rádio. Larijani et al. (2004) observaram que o aumento

da pressão está inversamente correlacionado com a DMO da cabeça do fêmur.

Em cultura de osteoblastos imaturos, a adição de Ang II aumenta o número de células pela ativação do receptor AT1 (HIRUMA et al., 1997; LAMPARTER et al., 1998), mas reduz sua maturação, a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos mineralizados (HAGIWARA et al., 1998). Por outro lado, osteoclastos cultivados isoladamente não respondem ao Ang II, que proliferam apenas na presença de osteoblastos, indicando estímulo da reabsorção óssea por meio de interação hormonal de modo dose-dependente (HATTON; STIMPELL; CHAMBERS, 1997).

2.3 Hipertensão na Reparação Óssea

Apenas quatro trabalhos são encontrados na literatura: Murata et al. (1967), Carvalho et al. (1983), Pereira et al. (2007) e Nobre et al. (2008), cada qual avaliando uma forma diferente da hipertensão ou local de reparação óssea.

Murata et al. (1967) e Carvalho et al. (1983) provocaram hipertensão renal, respectivamente em cães e ratos. Os cães tiveram seus pré-molares inferiores extraídos, e os ratos, o incisivo central direito. Em ambas as espécies, o processo de reparação do alvéolo foi mais lento nos animais hipertensos, com presença de osso imaturo e alteração no padrão de formação óssea.

Pereira et al. (2007) utilizaram ratos SHR e confeccionaram um defeito monocortical de 2mm no fêmur. Observaram que aos 21 dias houve maior quantidade de osso neoformado nos animais hipertensos, independente de gênero. Concluíram que os animais SHR apresentaram maior neoformação e maturidade

óssea na reparação dos defeitos que os animais normotensos. Nobre et al. (2008), com a mesma metodologia, observaram fechamento do defeito após o mesmo período, com presença de linhas de reversão basofílicas.

2.4 Ratos Espontaneamente Hipertensos

Os animais utilizados em experimentação originaram-se das regiões temperadas da Ásia, provavelmente onde hoje é o norte da China e Mongólia e, na primeira metade do século XVIII, adentraram a Europa Ocidental pela península norueguesa. Os ratos albinos foram levados aos laboratórios no começo do século XIX e, na Filadélfia em 1909, Helen Dean King iniciou a linhagem batizada com o nome do Instituto Wistar (HEDRICH, 2000).

A linhagem de ratos SHR foi obtida por Okamoto e Aoki (1963), a partir do cruzamento de animais WKY que apresentavam pressão diastólica superior a 150mmHg. Em cada geração, o aumento na pressão se manifestava em um número maior de indivíduos e com menor idade, atingindo 100% em 15 semanas na sexta geração. A própria linhagem Wistar tem uma incidência de hipertensão de 26,4% entre os machos e de 15,6% entre as fêmeas (OKAMOTO; AOKI, 1963). Este modelo genético é caracterizado por uma elevação da resistência total periférica e débito cardíaco normal, após a hipertrofia das paredes dos vasos (HEDRICH, 2000; HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001).

Os animais SHR foram distribuídos para os principais laboratórios mundiais a partir da geração 13 e 15, enquanto nos animais WKY isto ocorreu aproximadamente cinco anos mais tarde, após ainda serem submetidos a

cruzamentos não-consangüíneos (LOUIS; HOWES, 1990). Além disso, pelo cruzamento de machos SHR com fêmeas WKY, obteve-se duas linhagens de WKY: uma hipertensa e não-hipertensiva e a outra não-hipertensiva, mas hipertensiva (HENDLEY; OHLSSON, 1991). Apesar das diferenças clínicas, em termos genéticos não há divergências entre as linhagens WKY, SHR e SHR *stroke prone* (HILSDORF; KRIEGER, 1999).

Alterações na homeostasia óssea podem ser encontradas na comparação entre SHR e WKY, no qual o primeiro apresenta redução no volume e espessura do osso trabecular, e no número de trabéculas, além de maior atividade osteoclástica e menor atividade de osteoblastos e células osteoprogenitoras (WANG et al., 1993).

3 PROPOSIÇÃO

Investigar a reparação óssea em defeitos bicorticais, de 5mm de diâmetro no lado esquerdo e de 2mm de diâmetro no lado direito, confeccionados na região de ângulo de mandíbula de ratos espontaneamente hipertensos e de seus controles Wistar-Kyoto, por meio de avaliação histológica e histométrica da área do defeito, com coloração hematoxilina e eosina e o emprego de microscopia óptica convencional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Antes do início da pesquisa foi obtida a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Parecer de Aprovação nº 05/05 (Anexo A), assegurando que os animais seriam tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.1 Material

O seguinte material foi adquirido para a realização da pesquisa:

- 40 ratos machos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem SHR, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com no mínimo três meses de idade;
- 40 ratos machos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem WKY, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com no mínimo três meses de idade;
- equipamentos de apoio laboratorial:
 - instrumental cirúrgico (caixa-padrão composta por 1 tesoura de ponta fina, 1 espátula de Freer, 1 afastador tipo Volkman de três pontas, 1 afastador tipo Volkman de quatro pontas, 1 Hollenback 3s, 1 pinça para sutura, 1 pinça anatômica, 1 porta-agulha tipo Mayo-Hegar de 15cm,

- motor elétrico para cirurgia (modelo BLM350, marca Driller),
- peça angular redutora 4:1 (modelo Intra 3624, marca Kavo),
- cabeça redutora 4:1 (modelo 67 RIC, marca Kavo),
- broca cirúrgica esférica de 2mm de diâmetro (Dérig),
- trefina de 5mm de diâmetro externo (Dentoflex),
- balança de precisão digital 0,01g (modelo ARA520 Ohaus Adventurer, marca Toledo),
- câmara de sacrifício de dióxido de carbono em policarbonato (modelo GCSCO2G, marca Beiramar),
- cilindro de gás dióxido de carbono, capacidade 7 litros;
- material descartável:
 - aventais, gorro e campos em polipropileno,
 - máscaras, luvas, gaze, algodão, embalagens para esterilização,
 - seringa 1ml, agulha 13x4,5 26G, fio de sutura de seda 4-0,
 - álcool 70%, soro fisiológico,
 - gás dióxido de carbono;
- medicamentos:
 - anestésico quetamina (Dopalen – Agribands Brasil Ltda),
 - relaxante muscular (Rompun – Bayer SA),
 - antibiótico benzetacil (Eurofarma),
 - paracetamol (Tylenol® gotas, frasco de 15ml, Cilag Farmacêutica);
- material para processamento histológico:
 - cubas de vidro,
 - ácido fórmico (Sigma),

- cassete universal para inclusão em parafina (Metoma),
- navalha para micrótomo, para corte de parafina, alto perfil (Erviogas),
- lâminas para microscopia, extremidade fosca (Perfecta),
- corantes (hematoxilina de Harris, eosina),
- filme para lamínulas (Sakura).

4.2 Métodos

Como o local de procedência foi diferente do local de estudo – Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – foi necessário um período de adaptação de pelo menos 15 dias antes que a etapa cirúrgica fosse realizada. Durante o período de adaptação e o período pós-operatório, os animais receberam ração para roedores (Purina) e água *ad libitum*.

Para o procedimento anestésico, os animais foram pesados previamente e imobilizados manualmente. Após vigorosa fricção com álcool para anti-sepsia local, foi injetada a dose correspondente de quetamina a 100mg/kg e de xilazina a 10mg/kg, por via intraperitoneal.

Com a manifestação do efeito anestésico, a região ventral submandibular recebeu tricotomia e anti-sepsia com álcool (Figura 4.1). Com uma tesoura de ponta, o acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5cm de comprimento no sentido sagital; com o mesmo instrumento, foi feita a divulsão para separar a pele, do tecido muscular subjacente.

Figura 4.1 – Campo cirúrgico

O músculo masseter foi divulsionado inicialmente apoiando-se a ponta da tesoura na face externa do corpo da mandíbula (Figura 4.2); com a espátula de Freer completou-se a exposição da cortical vestibular da região do ângulo da mandíbula.

Figura 4.2 – Divulsão do músculo masseter

O campo cirúrgico foi mantido com afastadores de Volkman, enquanto confeccionava-se o defeito bicortical com trefina posicionada perpendicularmente à

superfície do osso, montada em contra-ângulo cirúrgico acionado por motor elétrico, e sob irrigação constante com soro fisiológico (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Confecção do defeito cirúrgico

Em todos os animais, no lado direito foi realizado o defeito circular de 2mm (Figura 4.4), diâmetro suficiente para a completa reparação do defeito, enquanto no lado esquerdo o diâmetro foi de 5mm (Figura 4.5), com o objetivo de observar o comportamento do defeito crítico (KABAN, GLOWACKI, 1981).

Figura 4.4 – Defeito de 2mm no lado direito

Figura 4.5 – Defeito de 5mm no lado esquerdo

Depois de realizado o defeito, a massa muscular foi reposicionada e o plano cutâneo suturado (Figura 4.6). Uma dose única de 16.000UI de benzetacil foi aplicada por via intramuscular após a cirurgia. Para a analgesia foi utilizado paracetamol na dose de 1mg/ml na água de beber, nos dois primeiros dias pós-operatórios.

Figura 4.6 – Pós-cirúrgico imediato

Para avaliação das etapas de reparação óssea, os animais das duas linhagens foram divididos em grupos de cinco indivíduos e sacrificados após 2, 3, 5,

10, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios, em câmara de dióxido de carbono para sacrifício.

As mandíbulas foram imediatamente removidas, por divulsão da pele e das inserções musculares e desarticulação do osso, preservando-se a massa muscular em torno da região do ângulo. As peças foram imersas em formol a 10% para fixação por no mínimo 24 horas; descalcificadas em ácido fórmico a 20% durante uma semana e então lavadas em água corrente por um dia, para remoção dos resíduos ácidos. Após a descalcificação, as mandíbulas foram seccionadas ao meio, em lado direito e esquerdo, diafanizadas em equipamento histotécnico e incluídas em parafina, com a face externa da mandíbula voltada para o corte.

Devido às irregularidades anatômicas da região do ângulo da mandíbula, após a descalcificação e a lavagem dos espécimes em água corrente, a face externa da mandíbula foi levemente desgastada em pedra de carboneto de silício até que a maior parte do contorno ósseo do defeito estivesse visível. A seguir, no momento da inclusão em parafina, o espécime foi pressionado contra o fundo da fôrma de bloco de parafina, de modo que a face se tornasse a mais plana possível.

Foi realizada coloração com hematoxilina e eosina para avaliação histológica e quantificação da neoformação óssea. As imagens foram capturadas em um microscópio trinocular Nikon Eclipse E200, com câmera Samsung CCD colorida SDC-313/243, e aumento de 40x (Figura 4.7).

Figura 4.7 – Imagem obtida no microscópio

A seguir, no programa Adobe Photoshop ® versão 6.0 (Adobe Systems Incorporated, USA), em cada imagem a área central do defeito foi delimitada e removida com a ferramenta Borracha, deixando o campo em branco (Figura 4.8).

Figura 4.8 – Delimitação do campo central do defeito

Para a quantificação, em valores absolutos, foi utilizado o programa de histometria digital Image J versão 1.4, em código fonte Java, de domínio público (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). O campo central em branco foi selecionado com a ferramenta Wand (tracing) e a área medida pelo comando Ctrl+M (Figura 4.9).

Figura 4.9 – Mensuração da área no programa Image J

Os dados foram analisados com o auxílio do programa de estatística Minitab 15® Statistical Software for Windows® versão 15.1.10 (Minitab Inc., EUA).

5 RESULTADOS

Durante o procedimento anestésico, houve perda de um animal em cada um dos grupos: WKY de 2 dias, 3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, e nos grupos SHR de 3 dias, 10 dias; e de dois animais no grupo SHR de 2 dias.

Em relação ao procedimento cirúrgico, os animais responderam favoravelmente, com recuperação pós-anestésica entre 4-6 horas, e atividade motora plena após 24 horas. Apresentaram edema facial com duração máxima de quatro dias, e não houve casos de infecção ou seqüela pós-cirúrgica.

Os dados sobre idade, cirurgia e sacrifício dos animais podem ser observados na tabela a seguir.

Tabela 5.1 – Cronograma do experimento na etapa cirúrgica

Linhagem	Período	Nascimento	Entrada	Cirurgia	Sacrifício
WKY	90 dias	20/03/06	06/06/06	20/06/06	18/09/06
	60 dias	26/06/06	18/08/06	30/11/06	29/01/07
	30 dias	23/06/06	18/08/06	25/10/06	24/11/06
	15 dias	17/04/06	13/06/06	19/07/06	03/08/06
	10 dias	12/11/08	16/01/08	19/02/08	29/02/08
	5 dias	20/07/06	10/10/06	29/11/06	04/12/06
	3 dias	12/11/08	16/01/08	19/02/08	22/02/08
	2 dias	15/11/08	16/01/08	19/02/08	21/02/08
SHR	90 dias	03/04/06	13/06/06	18/07/06	16/10/06
	60 dias	03/04/06	13/06/06	18/07/06	16/09/06
	30 dias	26/06/06	18/08/06	18/10/06	17/11/06
	15 dias	29/06/06	18/08/06	08/11/06	23/11/06
	10 dias	17/09/07	14/11/07	17/01/08	27/01/08
	5 dias	24/07/06	10/10/06	29/11/06	04/12/06
	3 dias	17/09/07	14/11/07	17/01/08	20/01/08
	2 dias	17/09/07	14/11/07	17/01/08	19/01/08

5.1 Aspecto macroscópico

O lado esquerdo da mandíbula, que recebeu o defeito de 5mm, sofreu considerável deformação anatômica na região do ângulo, visível principalmente após o período de 30 dias. Em nenhum espécime houve reparação completa do lado direito do defeito de 2mm até o período de 90 dias e não se observou deformação acentuada. O aspecto macroscópico das peças pode ser visto nas Figuras 5.1 a 5.14

¹.

¹ Devido a problemas técnicos não há o registro fotográfico das peças dos grupos WKY de 15 dias e SHR de 5 dias.

Figura 5.1 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 2 dias

Figura 5.2 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 3 dias

Figura 5.3 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 5 dias

Figura 5.4 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 10 dias

Figura 5.5 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 30 dias

Figura 5.6 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 60 dias

Figura 5.7 – Aspecto macroscópico do grupo WKY de 90 dias

Figura 5.8 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 2 dias

Figura 5.9 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 3 dias

Figura 5.10 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 10 dias

Figura 5.11 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 15 dias

Figura 5.12 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 30 dias

Figura 5.13 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 60 dias

Figura 5.14 – Aspecto macroscópico do grupo SHR de 90 dias

5.2 Achados histológicos

Nesta avaliação está descrita em seqüência de dias, a evolução da resposta de tecido ósseo à lesão induzida experimentalmente. Observou-se que o tecido ósseo respondeu ao estímulo agressivo de maneira semelhante em ambos os lados, direito e esquerdo, e em ambas as linhagens como segue. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100x.

5.2.1 Período de 2 dias

Presença de restos celulares, malhas de fibrina e necrose no centro da lesão. Osteoblastos reativos apresentam-se adjacentes a superfícies ósseas lesionadas, dispostas em camadas variando de aproximadamente 2 a 12 fileiras celulares. A deposição de matriz osteóide é discreta ou ausente. O tecido mesenquimal adjacente ao bordo de lesão demonstra-se aumentado em volume e reativo (Figura 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18).

Figura 5.15 – WKY de 2 dias, lado esquerdo

Figura 5.16 – WKY de 2 dias, lado direito

Figura 5.17 – SHR de 2 dias, lado esquerdo

Figura 5.18 – SHR de 2 dias, lado direito

5.2.2 Período de 3 dias

Diminuição dos restos celulares no centro da lesão, associados à proliferação de células do mesênquima. As camadas de osteoblastos apresentam-se mais espessas, acima de 10 células de espessura, com deposição de colágeno mais evidente em massa amorfa e eosinofílica, porém ainda discreta, principalmente encontrada associada ao bordo de lesão (Figura 5.19, 5.20, 5.21 e 5.22).

Figura 5.19 – WKY de 3 dias, lado esquerdo

Figura 5.20 – WKY de 3 dias, lado direito

Figura 5.21 – SHR de 3 dias, lado esquerdo

Figura 5.22 – SHR de 3 dias, lado direito

5.2.3 Período de 5 dias

No centro da lesão, observam-se células multinucleadas associadas aos discretos restos celulares e osso necrosado, além de fibrose e neo-angiogênese. Os osteoblastos na borda de lesão apresentam-se enfileirados, semelhantes a um epitélio na superfície dos primeiros ramos trabeculares de colágeno depositado, e aparecem os primeiros osteócitos ainda imaturos albergados por esta matriz extracelular. As células ósseas, a neovascularização e o tecido mesenquimal frouxo, que se assemelha ao da medula óssea, mostram-se em arranjo característico formando o osso imaturo. Alguns espécimes apresentam cartilagem imatura associada ao foco de reação óssea, encontradas principalmente nos lados direitos (Figura 5.23, 5.24, 5.25 e 5.26).

Figura 5.23 – WKY de 5 dias, lado esquerdo

Figura 5.24 – WKY de 5 dias, lado direito

Figura 5.25 – SHR de 5 dias, lado esquerdo

Figura 5.26 – SHR de 5 dias, lado direito

5.2.4 Período de 10 dias

A linha de reação periosteal aparece mais evidente, e as trabéculas do osso imaturo mostram-se mais espessas, com maior número de osteócitos imaturos, e vascularização definida em meio a matriz extracelular, e observa-se discreto padrão ósseo lamelar. Nos bordos voltados ao centro da lesão, são encontradas camadas de osteoblastos reativos ainda em franca atividade de deposição de matriz osteóide (Figura 5.27, 5.28, 5.29 e 5.30).

Figura 5.27 – WKY de 10 dias, lado esquerdo

Figura 5.28 – WKY de 10 dias, lado direito

Figura 5.29 – SHR de 10 dias, lado esquerdo

Figura 5.30 – SHR de 10 dias, lado direito

5.2.5 Período de 15 dias

As trabéculas mostram-se gradativamente mais espessas com diminuição de osteoblastos e deposição de colágeno no bordo voltado para o centro de lesão. Na superfície das trabéculas, os osteoblastos apresentam-se em fileira única de células. O colágeno depositado apresenta-se com formação lamelar, definindo o aspecto de osso secundário (Figura 5.31, 5.32, 5.33 e 5.34).

Figura 5.31 – WKY de 15 dias, lado esquerdo

Figura 5.32 – WKY de 15 dias, lado direito

Figura 5.33 – SHR de 15 dias, lado esquerdo

Figura 5.34 – SHR de 15 dias, lado direito

5.2.6 Período de 30 dias

Não há mais o aspecto de osso esponjoso, dando lugar ao osso compacto, no qual pode-se observar que as células apresentam-se dispostas caracteristicamente definindo o sistema de Harvers. Discretos osteoblastos reativos ainda são encontrados enfileirados em camadas duplas e triplas, na superfície óssea. Os osteócitos apresentam aspecto de maduros, e discretas trabéculas ósseas ainda são observadas (Figura 5.35, 5.36, 5.37 e 5.38).

Figura 5.35 – WKY de 30 dias, lado esquerdo

Figura 5.36 – WKY de 30 dias, lado direito

Figura 5.37 – SHR de 30 dias, lado esquerdo

Figura 5.38 – SHR de 30 dias, lado direito

5.2.7 Período de 60 e 90 dias

Não existem mais trabéculas ósseas; todas foram substituídas pelo arranjo em sistemas de Harvers e em osso compacto. Discretas células mesenquimais ainda persistem no bordo da lesão, apresentando-se enfileiradas em monocamada, semelhante a um epitélio simples. A linha de reação periosteal é dificilmente visualizada, devido ao arranjo definido. As lamelas de colágeno depositado são visíveis (Figura 5.39, 5.40, 5.41, 5.42, 5.43, 5.44, 5.45 e 5.46).

Figura 5.39 – WKY de 60 dias, lado esquerdo

Figura 5.40 – WKY de 60 dias, lado direito

Figura 5.41 – WKY de 90 dias, lado esquerdo

Figura 5.42 – WKY de 90 dias, lado direito

Figura 5.43 – SHR de 60 dias, lado esquerdo

Figura 5.44 – SHR de 60 dias, lado direito

Figura 5.45 – SHR de 90 dias, lado esquerdo

Figura 5.46 – SHR de 90 dias, lado direito

5.3 Análise estatística

As Tabelas 5.2 e 5.3 a seguir apresentam o resumo das medidas.

Tabela 5.2 – Médias por período segundo as diferentes variáveis

Período	WKY		SHR		Linhagem		Lado	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	WKY	SHR	Esquerdo	Direito
2	204430	120022	243058	103158	187548,4	159118	217306	107374
3	151788	94041	193904,3	98721	105590,4	139513,9	183375,3	96381
5	257070,8	60335,75	231000,8	92823,5	150785,2	179556,3	235543,4	85466,83
10	201817	89919,67	268953,7	85394	117894	177173,8	252169,5	87656,83
15	138789,5	57651,33	220870	127787	90106,6	194274,9	197418,4	85705,6
30	199301,7	52251,33	176818,2	49293	125776,5	140382,4	185249,5	51068
60	286471,8	87204	191524,8	38866,2	229538,1	106714,4	244273,1	52677
90	218360	66419,67	214711,8	63914,2	161382,4	130935,3	216738,6	64853,75
Total	223970	74376,65	214292,9	78567,71	152289,9	149881	218613,1	76677,63

Tabela 5.3 – Medidas-resumo segundo as diferentes variáveis, independente do fator período

Variável	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
WKY	152290	87255	30679	139207	341270
SHR	149881	80771	18989	155439	346222
Esquerdo (Esq)	218613	48877	124015	215121	346222
Direito (Dir)	76678	36678	18989	78091	147883
WKY-Esq	223970	51926	135668	226565	341270
WKY-Dir	74377	33739	30679	67091	136503
SHR-Esq	214293	46684	124015	205286	346222
SHR-Dir	78568	39439	18989	83376	147883

Para a identificação do modelo de distribuição dos dados e assim dos testes mais adequados para a análise estatística, foi utilizado o teste de aderência de Anderson-Darling que revelou a normalidade dos mesmos, tornando possível o emprego de testes paramétricos. Os níveis descritivos encontrados foram para WKY-Esq $p = 0,904$; WKY-Dir $p = 0,148$; SHR-Esq $p = 0,241$; e SHR-Dir $p = 0,113$.

O teste t para duas amostras revelou que não houve diferença significativa nas médias gerais entre WKY e SHR, independente dos períodos ou lados avaliados ($p = 0,884$) (Gráfico 5.1), e diferença significativa entre o lado esquerdo e o direito, independente das linhagens e períodos avaliados ($p < 0,001$) (Gráfico 5.2). Na comparação dos períodos com o teste de análise de variância simples, tanto a linhagem WKY quanto SHR não apresentou diferença significativa, respectivamente, $p = 0,101$ e $p = 0,479$.

Gráfico 5.1 – Evolução das médias gerais das linhagens segundo os períodos

Gráfico 5.2 – Evolução das médias por lado segundo os períodos

Na comparação dos lados com o teste de análise de variância simples, tanto a linhagem WKY quanto SHR apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o lado direito e o esquerdo, ambas as linhagens com $p < 0,001$ (Gráfico 5.3 e Gráfico 5.4).

Gráfico 5.3 – Comparação dos lados na linhagem WKY

Gráfico 5.4 – Comparação dos lados na linhagem SHR

Na comparação dos períodos por espécie no lado esquerdo, o teste de análise de variância simples revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,002$). Para encontrar em quais grupos ocorreram as diferenças, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey (intervalo de confiança de 95%). Os resultados mostraram que as diferenças ocorreram entre o grupo WKY de 15 dias *versus* grupo WKY de 60 dias ($p = 0,0042$) e *versus* grupo SHR de 10 dias ($p = 0,0459$), e grupo WKY de 60 dias *versus* grupo SHR de 30 dias ($p = 0,0053$) e *versus* grupo SHR de 60 dias ($p = 0,0491$). Ou seja, a área do defeito no grupo WKY de 15 dias foi menor que no grupo WKY de 60 dias e no grupo SHR de 10 dias, e no grupo WKY de 60 dias foi maior que no grupo SHR de 30 dias e SHR de 60 dias. A comparação dos períodos por espécie no lado direito pelo teste de análise de variância simples não mostrou diferença estatística ($p = 0,104$).

Na comparação por linhagem com o teste de análise de variância simples entre WKY e SHR, não houve diferenças nos lados esquerdo e direito, respectivamente, $p = 0,466$ e $p = 0,689$, independente do fator período.

6 DISCUSSÃO

Como pôde ser verificado na revisão de literatura, as investigações sobre hipertensão e osso foram baseadas em correlações entre medidas clínicas da pressão arterial e exames laboratoriais do metabolismo ósseo, ambos com resultados sujeitos às variações inerentes à raça humana, à metodologia empregada e à interpretação dos investigadores, conduzindo a conclusões por vezes antagônicas sobre o tema. Isto explica a dificuldade de se estabelecer a influência do aumento da pressão no metabolismo ósseo em humanos, e justifica a necessidade de utilizar modelos animais para o controle das variáveis experimentais.

Os parâmetros bioquímicos utilizados nas investigações podem representar tanto causas como resultados da hipertensão. O hormônio paratireoidiano reduz a pressão e produz o relaxamento vascular; seu aumento pode ser uma resposta reflexa à hipertensão e é observado em dietas com baixo teor de cálcio (GOTOH et al., 2005; YOUNG et al., 1995). A redução dos níveis séricos de cálcio, da DMO e do CMO, e o aumento da calciúria devem ser aceitos com reservas, pois foram achados em mulheres na pós-menopausa, nas quais é conhecido que a diminuição do estrógeno está associada à osteoporose (GOTOH et al., 2005; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001), além do que estas medidas também sofrem influência da dieta e de outros fatores como sobrepeso (AFGHANI; JOHNSON, 2006; AFGHANI; GORAN, 2007; GOTOH et al., 2005). A vitamina D, importante para a captação do cálcio, aumenta a resposta pressora à norepinefrina e, desta forma, pode estar associada à manutenção da hipertensão (GOTOH et al., 2005).

A idade é um fator que deve ser considerado nos estudos envolvendo hipertensão, pois há uma diminuição natural no metabolismo ósseo. Tsuda, Nishio e Masuyama (2001) admitiram que, embora não fosse estatisticamente significativa, a diferença de idade entre normotensas (57 ± 3 anos) e hipertensas (62 ± 2 anos) poderia influir na redução da DMO. Pérez-Castrillón et al. (2003a), com uma casuística de normotensas (56 ± 6 anos) e hipertensas pós-menopausa (59 ± 8 anos) de idades médias menores, não encontraram diferenças na DMO, exceto pelo aumento da excreção de cálcio; contudo, as hipertensas que apresentavam osteoporose tinham idade média superior (63 ± 8 anos) às hipertensas sem perda óssea (59 ± 9 anos). Afghani, Goran (2007), ao observarem uma redução do CMO em crianças e adolescentes hipertensos com sobrepeso, sugerem que a continuidade da doença na fase adulta possa trazer sérias consequências ao crescimento e homeostase ósseos.

Além disso, a influência do gênero na perda óssea com hipertensão associada foi pouco explorada. Os dados sobre a influência da pressão no metabolismo ósseo são contraditórios, tanto em mulheres quanto homens (AFGHANI; GORAN, 2007; AFGHANI; JONHSON, 2006; GOTOH et al., 2005; JANKOWSKA et al., 2002; LARIJANI et al., 2004; PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003a; PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003b; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001).

No presente estudo, os animais com aproximadamente três meses de idade, são considerados adultos jovens, adequados para a avaliação do metabolismo ósseo ativo. Contudo, a idade deve ser investigada em animais com mais de seis meses, devido às evidências de diminuição da massa óssea trabecular (WANG et al., 1993). Com relação ao gênero, a utilização de machos teve por objetivo eliminar a variável hormonal das fêmeas que pudesse influir na reparação óssea. Contudo,

as poucas diferenças encontradas nos períodos e linhagens avaliados permite supor que o mesmo experimento realizado com fêmeas talvez tivesse os mesmos resultados, excetuando talvez o fator idade.

Um outro ponto a ser considerado é o uso de medicação anti-hipertensiva. Tsuda, Nishio e Masuyama (2001) e Pérez-Castrillón et al. (2003a) não mencionam se as pacientes que fizeram parte da casuística faziam uso de medicação; Afghani, Johnson (2006) selecionaram pacientes não-medicadas. Em Pérez-Castrillón et al. (2003b), 80% das pacientes com genótipo II estavam sob tratamento anti-hipertensivo, enquanto 85% das pacientes ID e 100% DD não recebiam tal tratamento, embora não houvesse diferença nas médias pressóricas.

O emprego de antagonistas do receptor AT1, como o losartan, irbesartan, valsartan e candesartan, reduz a pressão arterial ao inibir o efeito da Ang II sobre a vasoconstrição, promove a reabsorção de sódio, a liberação de aldosterona, de renina, de catecolaminas e de vasopressina (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001). Por outro lado, a inibição do receptor AT1 aumenta o nível de Ang II circulante, devido ao aumento da atividade da renina plasmática; dessa forma, pode ocorrer uma hiper-estimulação dos receptores AT2 (DIHN et al., 2001; HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001). A ativação do receptor AT1 está associada à proliferação celular, e de AT2 à ação antiproliferativa e de apoptose, sobretudo em células do músculo liso de vasos (CAREY; SIRAGY, 2003; HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; INAGAMI et al., 1999).

Em culturas de células ósseas, Hiruma et al. (1997) e Lamparter et al. (1998) observaram que osteoblastos imaturos proliferavam na presença de Ang II; a existência de células jovens constituiria uma situação análoga ao início da reparação óssea, o que levaria supor que na hipertensão, este processo seria amplificado. Por

outro lado, a diferenciação e a mineralização são prejudicadas (HAGIWARA et al., 1998), e osteoblastos maduros não respondem à adição de Ang II (LAMPARTER et al., 1998), o que significa atraso na remodelação tardia. Além do mais, Ang II estimula de modo interativo com osteoblastos e dose-dependente, a atividade reabsortiva dos osteoclastos, e também Ang I por um sistema renina-angiotensina intrínseco das células ósseas que o convertem em Ang II (ERDOS; SKIDGEL, 1987; HATTON; STIMPELL; CHAMBERS, 1997; PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003b).

Dessa forma, a influência dos antagonistas do receptor AT1 na reparação tecidual, bem como a utilização de métodos específicos para investigar a qualidade do osso neoformado, ainda devem ser explorados.

O fechamento de um defeito bicortical na região de ângulo de mandíbula é dificultado pela pouca espessura e de tecido medular, fonte de células osteoprogenitoras. Defeitos monocorticais, com arcabouço em tecido esponjoso, como no trabalho de Pereira et al. (2007) e Nobre et al. (2008) apresentam neoformação mais rápida, porém os primeiros observaram que os osteoblastos estavam quiescentes no 21º dia, indicando que a atividade estaria reduzida e, nos normotensos, a neoformação ainda continuaria. Além disso, Pereira et al. (2007) não encontraram diferenças entre machos e fêmeas, enquanto para Nobre et al. (2008), as fêmeas exibiram apenas tecido conjuntivo denso e os machos, presença de trabéculas ósseas imaturas.

Embora tenha ocorrido uma diferença estatisticamente significativa no presente estudo, em que a área do defeito do lado esquerdo no grupo WKY de 15 dias foi menor que no grupo WKY de 60 dias e no grupo SHR de 10 dias, e no grupo WKY de 60 dias foi maior que no grupo SHR de 30 dias e SHR de 60 dias, a interpretação merece ressalvas. Em todos os animais, o lado esquerdo sofreu

deformação que pode ser atribuída à adaptação funcional. Apesar da reação osteoblástica logo no grupo de 2 dias, e presença de osso imaturo no período de 5 dias, em 15 dias o osso neoformado já apresentava características maduras em ambos as linhagens.

A linhagem WKY pode não ser considerada um controle adequado para experimentos envolvendo a linhagem SHR. As características de uma linhagem só podem ser consideradas definitivas após a 20ª geração de cruzamentos consangüíneos; os animais SHR não atingiram esta geração antes de serem liberados e os animais WKY ainda foram submetidos a cruzamentos não-consangüíneos antes de serem distribuídos aos laboratórios (HOLLENBERG; BRAUNWALD, 2001; LOUIS; HOWES, 1990). Apesar de Hilsdorf e Krieger (1999) não terem encontrado diferenças genéticas entre WKY e SHR, Louis e Howes (1990) alertam sobre a alta incidência de hipertensão na linhagem Wistar-Kyoto, e a necessidade de se utilizar uma linhagem isogênica que apresente pressão arterial normal. Além disso, foi particularmente observado neste estudo, que os animais WKY apresentavam comportamento pouco ativo, o que leva a supor à presença de hipertensão espontânea em alguns indivíduos, uma vez que existem duas linhagens WKY com traços antagônicos (HENDLEY; OHLSSON, 1991).

Se considerar que os animais WKY sejam pré-hipertensos, então os resultados encontrados no presente estudo com ambas as linhagens são similares aos de Murata et al. (1967) e Carvalho et al. (1983), no que diz respeito ao atraso na reparação óssea. A redução do aporte sangüíneo para os rins feita por esses autores aumenta a liberação de renina e, conseqüentemente, de Ang II, no mesmo processo que na hipertensão primária. Por outro lado, Castelli et al. (1978)

observaram que as arteríolas do osso maxilar de ratos com hipertensão renal induzida eram similares aos controles não-hipertensos.

De qualquer forma, outros métodos de avaliação e padrão comparativo deverão ser utilizados com a linhagem SHR e WKY, pois a hipertensão nos ratos SHR mimetiza um processo fisiopatológico encontrado nos humanos: o aumento da resistência periférica total e o espessamento das paredes dos vasos sangüíneos antes da manifestação da hipertensão (HEDRICH, 2000; BOBIK, 2005). E uma vez que a arquitetura vascular e a irrigação sangüínea são deficientes, alterações patológicas ocorrem no metabolismo dos tecidos vivos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados da comparação da reparação óssea ocorrida no defeito bicortical de 5mm, confeccionado no lado esquerdo, e no defeito de 2mm, no lado direito, entre ratos espontaneamente hipertensos e de seus controles genéticos Wistar-Kyoto, pode-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos avaliados.

REFERÊNCIAS¹

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

Afghani A, Johnson CA. Resting blood pressure and bone mineral content are inversely related in overweight and obese Hispanic women. *Am J Hypertens* 2006 Mar;19(3):286-92.

Bobik A. The structural basis of hypertension: vascular remodelling, rarefaction and angiogenesis/arteriogenesis. *J Hypertens* 2005 Aug;23(8):1473-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. [Cadernos de Atenção Básica; 16. Série A. Normas e Manuais Técnicos].

Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab* 2003 Aug;14(6):274-81.

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 Sep;25(3):214-20.

Castelli WA, Diaz-Perez R, Nasjleti CE, Caffesse RG. Effect of renovascular hypertension on the morphology of oral blood vessels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46(4):576-82.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci* 2001 May;100(5):481-92.

Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 1987 Apr;56(4):345-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Gotoh M, Mizuno K, Ono Y, Takahashi M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertens Res* 2005 Jul;28(7):565-70.

Guyton AC. Visão geral da circulação; a física médica da pressão, fluxo e resistência. In: Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 14, p. 136-43.

Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 1998 Mar;156(3):543-50.

Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 1997 Jan;152(1):5-10.

Hedrich HJ. History, strains and models. In: Krinke GJ, Bullock G, Bunton T. *The handbook of experimental animals: the laboratory rat*. London: Academic Press; 2000. cap. 1, p. 3-16.

Hendley ED, Ohlsson WG. Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Am J Physiol* 1991 Aug;261(2 Pt 2):H583-9.

Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jan;230(1):176-8.

Hilsdorf AW, Krieger JE. Characterization of six rat strains (*Rattus norvegicus*) by mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 1999 Mar;32(3):267-73.

Hollenberg NK, Braunwald E. *Hypertension : mechanisms and therapy*. Philadelphia: Current Medicine, 2001.

Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 Jul;26(7):544-9.

Jankowska EA, Susanne C, Rogucka E, Medras M. The inverse relationship between bone status and blood pressure among Polish men. *Ann Hum Biol* 2002 Jan-Feb;29(1):63-73.

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992 Oct 2;71(1):169-80.

Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J Dent Res* 1981 Jul;60(7):1356-64.

Kassab GS. Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. *J R Soc Interface* 2006 Dec 22;3(11):719-40.

Lamparter S, Kling L, Schrader M, Ziegler R, Pfeilschifter J. Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. *J Cell Physiol* 1998 Apr;175(1):89-98.

Larijani B, Bekheirnia MR, Soltani A, Khalili-Far A, Adibi H, Jalili RB. Bone mineral density is related to blood pressure in men. *Am J Hum Biol* 2004 Mar-Apr;16(2):168-71.

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 Suppl 7:S1-5.

Morlin MT, Shinagawa A, Chin VKL, Deboni MCZ, Naclério-Homem MG, Campos AC. Prevalência de hipertensos e diabéticos atendidos no ambulatório de Cirurgia Odontológica da FOUSP: resultado preliminar. In: Proceedings of the 22nd Annual SBPqO Meeting; 2005 Sep 3-7; Águas de Lindóia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2005. p. 203, Res. Pc006.

Murata M, Itoi S, Nonoguchi T, Ota T, Yokota M. Histological study on the healing processes of extraction sockets in the experimental hypertensive dogs. *Kyoto Daigaku Kokukagaku Kiyo* 1967;7(2):122-39.

Nobre MD, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Ação local do alendronato sódico na reparação óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). *Arq Bras Cardiol* 2008 Apr;90(4):261-8.

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

Patel JR, Wuehrmann AH. A radiographic study of nutrient canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42(5):693-701.

Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos machos e fêmeas espontaneamente hipertensos: estudo histológico e histométrico. *Arq Bras Cardiol* 2007 Jan;88(1):104-9.

Pérez-Castrillón JL, Justo I, Silva J, Sanz A, Igea R, Escudero P, et al. Bone mass and bone modelling markers in hypertensive postmenopausal women. *J Hum Hypertens* 2003a Feb;17(2):107-10.

Pérez-Castrillón JL, Justo I, Silva J, Sanz A, Martin-Escudero JC, Igea R, et al. Relationship between bone mineral density and angiotensin converting enzyme polymorphism in hypertensive postmenopausal women. *Am J Hypertens* 2003b Mar;16(3):233-5.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990 Oct;86(4):1343-6.

Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001 July;14(7 Pt 1):704-7.

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

Young EW, Morris CD, Holcomb S, McMillan G, McCarron DA. Regulation of parathyroid hormone and vitamin D in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1995 Oct;8(10 Pt 1):957-64.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
PROTOCOLO nº 05/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Avaliação histológica e histométrica da reparação óssea em defeitos bicorticais no ângulo de mandíbula de ratos geneticamente hipertensos (SHR) e de controles Wistar-Kyoto”***, de responsabilidade da pesquisadora **Verônica Kei Len Chin**, sob orientação da Professora Doutora **Maria da Graça Naclério-Homem**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 15 de abril de 2005

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Chin, Verônica Kei Len

Avaliação histológica da reparação óssea em defeitos bicorticais no ângulo de mandíbula de ratos geneticamente hipertensos e de seus controles Wistar-Kyoto / Verônica Kei Len Chin; orientadora Maria da Graça Naclério-Homem. -- São Paulo, 2008.

78p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Reparo ósseo – hipertensão arterial – Defeitos bicorticais 2. Cirurgia bucomaxilofacial

CDD 617.605
BLACK D76

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: