Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Fator de Crescimento Endotelial Vascular na Doença
Periodontal Inflamatória Induzida
Experimentalmente em Ratos

THAIS MARCHINI DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de Odontopediatria.

BAURU
2007

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Fator de Crescimento Endotelial Vascular na Doença
Periodontal Inflamatória Induzida
Experimentalmente em Ratos**

THAIS MARCHINI DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

**BAURU
2007**

Oliveira, Thais Marchini
OI4f Fator de Crescimento Endotelial Vascular na Doença
Periodontal Inflamatória Induzida Experimentalmente
em Ratos/ Thais Marchini de Oliveira -- Bauru, 2007.
xx, 144 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB-
USP: projeto de pesquisa aprovado em 06 de maio de 2005.

Número do protocolo: n°.17/2004

Dados Curriculares

Thaís Marchini de Oliveira

01 de dezembro de 1975

Nascimento Bauru – SP

Filiação

José Marchini de Oliveira e
Marilene Rodrigues de Oliveira

1994-1997

Curso de Graduação na Faculdade de
Odontologia de Araçatuba – UNESP.

1998-1999

Curso de Especialização em
Odontopediatria, na Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP.

1998-2000

Curso de Especialização em
Endodontia, no Hospital de
Reabilitação de Anomalias
Craniofaciais de Bauru – USP.

2001-2003

Curso de Pós-Graduação em
Odontologia em nível Mestrado, Área
de Odontopediatria, na Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP.

2003 - Atual

Curso de Pós-Graduação em
Odontologia em nível Doutorado, Área
de Odontopediatria, na Faculdade de
Odontologia de Bauru – USP.

“Um dia você aprende que...

O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida...

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo...

E descobre que o tempo não é algo que possa voltar para trás...

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores...

E você vai descobrir que realmente pode suportar...

Que realmente é forte e que pode ir muito mais longe, mesmo depois de pensar que não se pode mais...

Então, você entende que a vida tem valor, e que você tem valor diante da vida!”

Senhor **DEUS**, obrigada por me iluminar em mais uma jornada, guiando meus passos para que todos os obstáculos encontrados fossem superados.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **José Marchini de Oliveira** e **Marilene Rodrigues de Oliveira**, exemplo de dedicação, trabalho e amor pela família, que sempre estiveram me ensinando a trilhar os caminhos da vida e nunca mediram esforços para garantir meus estudos, sonhos e ideais. Hoje colho os frutos das sementes que juntos plantamos. É difícil transformar em palavras sentimentos tão intensos de amor e gratidão. Amo vocês, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, **Karina** e **Thiago**, pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos da minha vida, e pelo grande amor e carinho demonstrados a cada dia. Eu tenho muito orgulho de vocês. Amo vocês!

Ao meu querido **Fabrício**, presente lindo de Deus na minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo, força, amizade, compreensão e principalmente pelo seu amor. O que sei, o que sou e o que faço, devo tudo a você. Amo muito você!

À minha avó, **Maria José**, que nunca deixou de me abençoar em todos os momentos da minha vida.

À **Tia Aninha**, **Tio Gic** e **Mariana** pelo amor, carinho e incentivo, por serem pessoas especiais presente na minha vida me apoiando nas decisões mais difíceis. Vocês são especiais!

MEU RECONHECIMENTO E ADMIRAÇÃO

A todos os mestres,
que têm me ensinado
o valor do aprender
A necessidade da busca
A riqueza dos verbos
A simpatia do sorriso
A força da perseverança
A importância das mudanças
A necessidade de recomeçar,
A tolerância e a humildade
A evolução da ciência
A força do amor
E a beleza de DEUS.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, meu orientador, obrigada por reconhecer meus méritos e me dar oportunidades, serei eternamente grata. Entre as coisas que aprendi com você está a necessidade de fazer bem feito qualquer coisa que se faça. Obrigada pela paciência, sabedoria, rigor científico e apurado senso crítico, que muito contribuíram para concretização deste trabalho. Agradeço pela orientação precisa e atenciosa. Muito obrigada por tudo que fez por mim, fazendo-me trilhar o caminho por mim mesma, pelo seu incentivo, exemplo, amizade e principalmente pela confiança depositada em mim.

A **Prof^a Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, aprendi com você a pensar grande e nunca aceitar não como resposta. Você é uma pessoa especial, com entusiasmo pela vida. Consegue transformar desafios em grandes oportunidades. Com certeza um dia vou retribuir todas as oportunidades que você proporciona. Agradeço pela competência, pelos

conhecimentos científicos compartilhados e pelo apoio prestado sempre no momento certo. Serei eternamente grata pela confiança em mim depositada.

Ao **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, meu eterno orientador, não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. Muito obrigada por tudo.

A **Prof^a Dr^a. Salete Moura Bonifácio da Silva**, sua simplicidade e enorme sabedoria foram e sempre serão qualidades valiosas a serem seguidas no desenvolvimento de um docente. Serei sempre grata. Obrigada pela valiosa contribuição para a minha formação profissional e principalmente pela confiança.

Ao **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, pelos ensinamentos transmitidos, que muito contribuíram para o meu enriquecimento no campo da Odontopediatria.

A todos os professores da disciplina de Odontopediatria, **Aymar Pavarini, Bernardo Gonzáles Vono, José Eduardo de Oliveira Lima, Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Maria Thereza Francisca Borro Bijella, Ruy César Camargo Abdo, Salete Moura Bonifácio da Silva**, por minha formação nesta especialidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Muitas pessoas têm me ajudado a ser a pessoa que quero ser todos os dias e vocês de uma forma ou de outra contribuíram para isso. Saibam que cada um de vocês tem o seu exato valor na minha vida, nas minhas lembranças, no meu futuro e em tudo que faço.

As grandes amigas de república **Maria Cláudia, Juliana, Eve e Lidiane** pela amizade que supera qualquer distância e pelo carinho. Vocês são muito especiais!

À amiga **Vivien**, pela amizade e companheirismo. Pessoa íntegra, dedicada e de enorme caráter. Exemplo de profissional competente e determinado senso crítico. Aprendi muito com você. Agradeço a valiosa contribuição e pelo trabalho em equipe realizado. Obrigada pela convivência, pelos ensinamentos e pela confiança. Serei sempre grata por tudo.

Ao amigo **Thiago Cruvinel**, pela amizade e profissionalismo. Obrigada pela honestidade, competência e dedicação pelo trabalho. Agradeço a confiança, ajuda e o trabalho em equipe que conseguimos realizar. É muito gratificante trabalhar com pessoas como você. Obrigada por tudo.

Ao amigo **Thiago José Dionísio**, pela competência, profissionalismo, amizade e dedicação. Obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre quando questionado, pela atenção e por todos os conhecimentos compartilhados. Agradeço pela ajuda prestada em diversos momentos deste trabalho. Obrigada pelo exemplo de sensatez e educação. Sem você tudo teria sido muito mais difícil. Muito obrigado por tudo!

À amiga **Ana Eliza Akashi**, que admiro muito pela amizade e incentivo em todas as horas. Profissional exemplar.

À amiga **Vivi**, pelo apoio e amizade em todos os momentos deste trabalho. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração que você e o **Mano** me proporcionaram. Vocês são especiais!

À amiga **Tiza**, pelo incentivo, amizade e exemplo de mãe dedicada.

As amigas **Bella e Karin**, pelo apoio, amizade e momentos de alegria que vocês proporcionaram durante este trabalho.

À amiga **Mariana Gigliotti**, pela amizade, carinho e exemplo de dedicação aos estudos. Obrigada por mostrar que vale a pena ser professor.

Aos colegas de pós-graduação: **Dani, Lili, Érika, Heitor, Dani Rios, Marcelo, Marina, Adriano, Glades, Dafna, Ana Paula, Evaristo, Andréa Anzai, Carla Sipert, Carol Morandini, Adriana Calvo e Marineli**, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela convivência e pela ajuda nos diversos momentos em que precisei.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Mariana, Bruna, Thiago, Carol, Léo, Paulo, Anderson, Paula, Fabíola e Marcela**, obrigada pela convivência e aprendizado.

As minhas amigas **Carol e Carmen**, pela amizade, competência e profissionalismo. Sem a ajuda de vocês seria muito difícil a concretização deste trabalho. Serei sempre grata por tudo.

À amiga **Adriana**, obrigada pelo carinho, amizade, estímulos constantes e pela convivência agradável.

À amiga **Cláudia**, pela amizade, profissionalismo e pelo exemplo de pessoa que você é. Obrigada por todos os momentos agradáveis, pela ajuda sempre oferecida. Eu admiro muito você.

À amiga **Ana Lúcia**, pela palavra amiga e de companheirismo sempre presentes.

À amiga **Priscila Zambonato**, pela amizade mantida mesmo que à distância.

À amiga **Janete Galante**, pelo incentivo, apoio e amizade.

À amiga **Carol Lopes**, pelo exemplo de força. Obrigada pela amizade e apoio prestado durante o período desta pesquisa.

Ao **Ivan, Arlene, Danilo e Liciane**, pela amizade, carinho e incentivo sempre presente. Obrigada por tudo.

Ao **Dr. Fernando, Arlete, Rafael, Paola e Fernanda** pelo carinho e amizade que sempre me receberam.

A todos os meus médicos, em especial, **Dr. Paulo e Dr. Alan**, pelo carinho que sempre me receberam e pela capacidade incomum, que alia talento profissional, humildade e sensatez, desprendida de vaidade e arrogância. Obrigada por tudo.

As amigas do departamento de odontopediatria **Lia, LÍlian, Fátima, Estela, Márcia e o Peterson**, pela amizade, colaboração e apoio incessante em todos os momentos, agradeço de coração pela grande ajuda e atenção sempre presente.

Ao professor **José Roberto Lauris**, por todos os conhecimentos e explicações transmitidas em relação à análise estatística desse trabalho.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas e as Disciplinas de Farmacologia, Fisiologia, Histologia, Patologia e Anatomia** por propiciarem e facilitarem a realização deste trabalho através da concessão de seus

materiais e equipamentos. Agradeço aos professores, **Dr. Flávio, Dr. Alceu, Dr^a Inge, Dr. Gérson, Dr. Rumio, Dr. Gustavo, Dr. Luís Antônio Taveira, Dr. Jesus e Dr. Antonio de Castro** e todos os funcionários

À **Vera**, Secretária de Departamento de Ciências Biológicas, pelo incentivo, apoio e por ser sempre prestativa.

À **Fatiminha**, técnica do Departamento de Patologia, obrigada pela amizade e disposição constante em ajudar.

À **Tânia**, técnica do Departamento de Histologia, sua ajuda foi indispensável durante as etapas desta pesquisa. Obrigada pela atenção e competência.

À **Dra Elza**, pelo incentivo, apoio e pronta permissão na utilização dos equipamentos do HRAC - USP (Centrinho).

Aos funcionários do biotério central da FOB/USP, **Luiz, Erasmo, Elias e Richard**, sempre muito prestativos. Obrigada pela ajuda e incentivo.

Aos **funcionários da Biblioteca**, pela atenção e serviços prestados.

Aos **pacientes** que muito contribuíram para o meu enriquecimento profissional.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho, Deus abençoe todos vocês!!!

AGRADECIMENTOS ADMINISTRATIVOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa do senhor diretor, **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, e da senhora coordenadora de pós-graduação, **Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

Sumário

RESUMO	xxii
1 Introdução e Síntese Bibliográfica	3
2 Proposição	21
3 Material e métodos	25
3.1 Animais e caracterização dos grupos experimentais	25
3.2 Indução experimental da doença periodontal inflamatória por meio da colocação de ligadura	25
3.3 Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos e número de animais	29
3.4 Análise Microscópica	33
3.5 Extração de RNA total das biópsias de tecido gengival	33
3.6 Quantificação do RNA total	34
3.7 Avaliação da qualidade do RNA total	34
3.8 Tratamento do RNA total com DNase	35
3.9 Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	35
3.10 Estudo da intensidade de expressão de RNAm	37
3.11 Western Blot	38
3.12 Análise Imunohistoquímica	39
3.13 Análise Estatística	40
4 Resultados	45
4.1 Observação Macroscópica Clínica	45
4.2 Análise Microscópica	49
4.2.1 Tecidos periodontais sadios	49
4.2.2 Tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme por meio da colocação de ligadura em ratos não tratados com meloxicam	55

4.2.3 Tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme por meio da colocação de ligadura em ratos tratados com meloxicam.....	67
4.3 Análise da expressão de RNAm	77
4.3.1 RT-PCR.....	77
4.4 Análise da expressão da proteína VEGF	82
4.4.1 Western Blot.....	82
4.4.2 Cortes histológicos marcados pela imunohistoquímica	84
5 Discussão	105

5.1 A Amostra.....	105
5.2 Metodologia	107
5.3 Precisão da Metodologia	109
5.4 Resultados	110
5.5 Uso de antiinflamatório na odontologia	118
5.6 Implicações Clínicas.....	119

6 Conclusão	125

Referências bibliográficas	129

ABSTRACT	143

Lista de Abreviaturas e Símbolos

° = graus

et al = e colaboradores

HE = hematoxilina-eosina

RT = transcrição reversa

RT-PCR = transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

PCR = reação em cadeia da polimerase

VEGF = fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR-1 = receptor 1 para VEGF

VEGFR-2 = receptor 2 para VEGF

COX-2 = cicloxigenase 2

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

DEPC = água com dietil pirocarbonato

PIS = solução de isolamento de proteínas

PMSF =fenil metil sulfonil fluoreto

TBS = solução salina tamponada por tris

PBS = tampão fosfato salina

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

DAB = solução líquida de 3,3' - diaminobenzidina

PMN = polimorfonucleares

DTT = Ditionitrito

dNTPs = nucleotídeos (A, T, C e G)

cDNA = DNA complementar

RNA_m = RNA mensageiro

FOB/USP = Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

---

*R*ESUMO

RESUMO

A doença periodontal é caracterizada por alterações inflamatórias, como vermelhidão e edema da margem gengival, sangramento provocado, alterações no contorno gengival e perda óssea alveolar. Evidências recentes sugerem que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pode ser um mediador importante na doença periodontal inflamatória. Portanto, este trabalho teve como objetivos avaliar durante a progressão da doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos: 1) o efeito do meloxicam, inibidor preferencial da COX-2, na perda óssea alveolar; 2) a cinética de expressão de RNAm para COX-2, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2; e 3) a cinética de expressão da proteína VEGF. Cento e vinte (120) ratos foram aleatoriamente divididos em: grupo 1 (sem tratamento com meloxicam) e grupo 2 (tratados com meloxicam). Ligaduras de fio de seda foram colocadas na margem gengival do primeiro molar inferior direito de todos os ratos. O grupo 2 foi tratado por 3, 7, 14 e 30 dias com meloxicam (3 mg/kg/dia, via intraperitoneal) e o grupo 1 foi usado como controle. As técnicas utilizadas para as análises foram: análise microscópica, RT-PCR, Western Blot e imunohistoquímica. Os resultados foram submetidos à análise de Correlação de Pearson, Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, sendo adotado nível de significância de 5%. Observou-se, neste estudo, que o meloxicam foi efetivo em diminuir a perda óssea alveolar nos tecidos periodontais em todos os períodos de indução da doença periodontal. Experimentos de RT-PCR revelaram correlação positiva da cinética de expressão de RNAm para COX-2 e VEGF nos tecidos gengivais afetados pela doença periodontal inflamatória ($R=0,80$). A expressão de RNAm para VEGF

na doença periodontal inflamatória, no período de 14 dias, diminuiu no grupo de animais tratados com meloxicam, mostrando diferença estatisticamente significativa quando comparado com os animais não tratados ($p=0,023$). Não houve diferença significativa na expressão de RNAm para os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 no tecido gengival em nenhum dos períodos de indução da doença periodontal. Nos experimentos de Western Blot houve tendência de menor expressão da proteína VEGF na doença periodontal inflamatória no período de 14 dias nos animais tratados com meloxicam ($p=0,08$). Em experimentos de imunohistoquímica foi detectado aumento da expressão da proteína VEGF nos tecidos afetados pela doença periodontal em todos os períodos estudados, bem como diminuição da expressão desta proteína nos tecidos periodontais dos animais tratados com meloxicam. Portanto, a análise conjunta dos dados sugere importante participação do VEGF na doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos e o meloxicam, inibidor preferencial da COX-2, pode modificar a progressão da doença periodontal neste modelo experimental por diminuir a perda óssea e a expressão de VEGF.

Palavras-Chave: Antiinflamatório. Cicloxigenase-2. Doença periodontal. Fator de crescimento vascular endotelial. Inflamação. Meloxicam. Perda óssea alveolar.

*I*NTRODUÇÃO E
*S*ÍNTESE *B*IBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 – INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta bioquímica celular de defesa natural do organismo, não específica, imediata, iniciada após qualquer lesão celular^{27,43,64,101}. A lesão celular pode ocorrer como resultado de trauma, distúrbios genéticos ou imunes, agentes químicos, extremos de temperatura, radiação e microrganismos^{15,27,43,64,101}. Pode ser definida como uma resposta local do tecido vascularizado agredido, caracterizada por alterações do sistema vascular, dos componentes líquidos e celulares, bem como por adaptações do tecido conjuntivo vizinho. Essas alterações dos componentes teciduais são resultantes de modificações que ocorrem nas células agredidas, estas passando a adquirir comportamentos diferentes: movimentos novos, alterações de forma e liberação de enzimas e de substâncias químicas^{15,27,99}. No processo inflamatório os vasos sangüíneos dilatam-se e tornam-se mais permeáveis, resultando no aumento do fluxo sangüíneo e na dispersão de plasma e células para a matriz extracelular. Toda essa transformação morfológica e funcional do tecido, característica dos processos inflamatórios, visa destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual^{99,101}.

A inflamação apresenta três etapas: alterações vasculares (mudanças no calibre/fluxo vascular e incremento na permeabilidade vascular); extravasamento de leucócitos e fagocitose (adesão/transmigração e quimiotaxia); e reconstituição tecidual e crescimento celular. O evento mais importante na fase inicial da inflamação corresponde ao aumento local da permeabilidade vascular, resultando em infiltração celular e exudação de fluido

---

rico em proteínas^{27,101}. Tais alterações vasculares levam aos sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, edema e dor^{27,101,124}. Essa reação inflamatória também pode iniciar um processo de reabsorção, tendo como resultado perda do volume de tecido duro¹⁰¹.

O processo inflamatório é influenciado pela ação de determinadas substâncias químicas liberadas ou formadas enzimaticamente no local da lesão. O grande número de produtos celulares pode ser resumido em quatro categorias: citocinas, hormônios, mediadores e fatores de crescimento. Uma citocina é uma proteína de baixo peso molecular ativa biologicamente que altera a função da célula que a liberou ou a função das células adjacentes. As citocinas têm ampla variedade de ações combinadas com a redundância funcional dentro do sistema inflamatório^{45,51,128}. Hormônios são moléculas biologicamente ativas liberadas na corrente sanguínea, que estimulam a atividade funcional das células distantes do local de secreção⁷⁴. Os mediadores são proteínas plasmáticas bem como agentes liberados dos mastócitos e outros tipos celulares¹⁵. Os fatores de crescimento são uma família complexa de moléculas sinalizadoras que regulam a diferenciação, proliferação, crescimento e maturação das células¹²⁸.

Frente à grande quantidade de moléculas inflamatórias, fica óbvio que cada uma tem sua importância e participação no processo inflamatório. Entretanto, uma análise mais atenta deste processo sugere que este sistema complexo não é plenamente compreendido de modo que não se sabe com precisão quais moléculas estão envolvidas em cada momento. Se considerarmos a redundância funcional de muitas citocinas sobre os componentes celulares, moleculares, bioquímicos e genéticos da inflamação,

---

torna-se difícil identificar aquelas moléculas que são necessárias e exigidas para um evento inflamatório específico^{27,43,51}. O papel essencial das moléculas durante a inflamação precisam ser melhor compreendido, pois o significado biológico da inflamação é primordialmente associado à defesa do corpo contra lesões e infecções no sentido de manter o equilíbrio homeostático.

1.2 – INFLAMAÇÃO E DOENÇA PERIODONTAL

Entre os processos inflamatórios que afetam a dentição humana, as doenças periodontais são as mais comumente observadas. Essas doenças compreendem um grupo de lesões que afetam os tecidos periodontais de proteção (gengiva), denominando-se gengivite, induzida por biofilme dentário, e os tecidos de sustentação (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), denominando-se periodontite, levando à perda dentária. Existem diferentes formas de periodontite, que podem afetar os indivíduos em suas diferentes fases da vida^{41,60,124}.

As periodontites compreendem um grupo de desordens com diferentes etiologias e aparências clínicas^{41,94}. A periodontite agressiva compreende um grupo de doenças periodontais que afetam crianças, adolescentes e adultos jovens, sendo caracterizada por uma rápida perda de tecido periodontal em indivíduos com suposta saúde periodontal^{5,120}. Em contraste, a periodontite crônica é caracterizada principalmente pela lenta progressão da perda de inserção periodontal⁴¹. Tem-se demonstrado que disfunção dos neutrófilos e anormalidades no sistema imune contribuem mais para a patogênese da periodontite agressiva do que para a periodontite crônica^{41,60,124}. As doenças periodontais inflamatórias incluem diversas alterações inflamatórias tanto nos

---

tecidos de proteção quanto de sustentação dos dentes, sendo caracterizada, em suas fases mais avançadas, especialmente pela destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais⁴¹. O agente etiológico primário destas doenças é o biofilme dentário, composto principalmente por bactérias colonizadoras da superfície dentária, inicialmente gram-positivas^{59,87,124}. A partir do crescente acúmulo de microrganismos do biofilme dentário na margem gengival, alterações no microambiente possibilitam a colonização de bactérias gram-negativas⁶. Esta organização confere condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, uma vez que atuam como barreira, retraindo substâncias produzidas pelas próprias bactérias e, ao mesmo tempo, protegendo-as de fatores de defesa do organismo hospedeiro e de agentes antimicrobianos externos^{59,87}. Então, os componentes típicos desta espécie, como os lipopolissacarídeos (LPS), surgem e supostamente interagem com receptores de superfícies do epitélio sulcular, atingindo o tecido conjuntivo, onde entram em contato com fibroblastos, células endoteliais e leucócitos¹²⁴. Clinicamente, essa fase inicial reflete alterações inflamatórias restritas ao periodonto de proteção, caracterizadas como vermelhidão e edema da margem gengival, sangramento provocado, alterações no contorno gengival, bem como perda de adesão tecidual e aumento do fluxo do fluido gengival, no intuito de diluir e eliminar o agressor^{6,41,60}. Estabelece-se, então, o quadro de gengivite, que não envolve perda de inserção periodontal e é reversível perante a remoção do biofilme dentário.

A persistência do biofilme dentário em íntima proximidade aos tecidos periodontais, possibilitando contínuo estímulo antigênico, transforma a resposta

---

inflamatória, inicialmente aguda, na qual predominam alterações vâsculo-exsudativas e degradação de colágeno, em lesão crônica, com proliferação do epitélio juncional e da bolsa periodontal, com perda de suporte dentário caracterizado pela reabsorção óssea alveolar. Dessa forma, a periodontite crônica pode ser definida como uma doença tipicamente crônica e continuamente progressiva, que apresenta repentinos indícios de atividade^{41,60,124}. A constante modificação do microambiente local possibilita o desenvolvimento de um biofilme dentário subgengival, caracterizado por uma microbiota principalmente gram-negativa anaeróbia e de espiroquetas⁶⁵. O desenvolvimento desta microbiota e a continuidade do acúmulo de biofilme dentário resultam em uma grande quantidade de produtos microbianos. Esta intensa carga antigênica no sulco gengival, por sua vez, ocasiona aumento marcante na dimensão da resposta do hospedeiro⁴¹.

Atualmente, há um crescente alerta para as interações potenciais entre os mediadores químicos da inflamação e os fatores de crescimento. Estes produtos celulares podem contribuir na modulação dos eventos celulares e humorais dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e assim, provavelmente participar da patogênese de condições inflamatórias como a doença periodontal inflamatória^{5,6,41,60,114,120,124}. Embora a doença periodontal inflamatória resulte, primariamente, de uma resposta inflamatória à presença de bactérias no biofilme dentário, é a natureza da resposta inflamatória que determina a característica destrutiva da doença. Com o aumento da presença de bactérias, seus produtos interagem com o epitélio gengival para induzir a expressão e produção de mediadores químicos da inflamação^{60,124}.

Além das doenças periodontais representarem a maior causa de desconforto, desfiguração e perda de dentes na população mundial, novas evidências científicas vêm sugerindo que especialmente as periodontites aumentam o risco de certas doenças sistêmicas, como as cardiopatias, doenças respiratórias e doenças coronárias, bem como o nascimento de bebês prematuros e/ou de baixo peso e possivelmente outras condições^{30,46,57}.

1.3- CICLOXIGENASE-2 (COX-2) E INFLAMAÇÃO

Interações entre patógenos microbianos e vários sistemas de resposta do hospedeiro desempenham papel crítico no desenvolvimento e progressão da doença periodontal inflamatória via liberação de mediadores inflamatórios e imunológicos^{6,12,94}. A inflamação e a destruição tecidual são eventos iniciais e constantes durante o processo mediado pelo hospedeiro em resposta à infecção bacteriana^{27,124}. Um importante mecanismo nesse processo é a ativação da cascata do ácido araquidônico, formado a partir dos fosfolípidos de membrana por meio da ação enzimática da fosfolipase A₂, que leva à síntese de metabólitos dessa substância com potentes propriedades pró-inflamatórias^{12,27,99,114}.

O ácido araquidônico pode servir como um substrato precursor para duas vias enzimáticas: a via das cicloxigenases e a via das lipoxigenases. O metabolismo do ácido araquidônico via cicloxigenases resulta na produção de prostaglandinas (PG), tromboxanas e prostaciclina e via lipoxigenases são formados leucotrienos e lipoxinas^{15,27,86,99,131}.

A cicloxigenase (COX) representa a enzima limitante na produção de prostaglandinas^{27,52,86}, a qual pode estar presente na maioria dos tipos

---

celulares, incluindo células epiteliais, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos^{27,52,79,111}. Existem três isoformas conhecidas da COX, designadas como COX-1, COX-2 e COX-3^{14,22,24,26,40,52,91,125}. Os genes são regulados por sistemas independentes e diferentes, apesar da reação enzimática por eles catalisada ser idêntica^{29,113,125}.

Muitos dos efeitos constitutivos de manutenção homeostática da COX são mediados pela COX-1, enquanto muitos dos efeitos inflamatórios e induzíveis são mediados pela COX-2^{26,27,29,52,79,125}. A terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, é uma proteína derivada da COX-1^{14,22}. Esse fato é indicado pela especificidade tecidual de expressão de cada isoforma; a COX-1 é uma enzima constitutiva expressa em quase todos os tecidos humanos, ou seja, uma enzima que participa das funções fisiológicas importantes do organismo, como agregação plaquetária, manutenção da função renal e citoproteção gastrointestinal; enquanto a COX-2 é uma enzima que se apresenta em níveis baixos ou não detectáveis em tecidos sadios²⁹, sendo altamente expressa em tecidos inflamados²⁶ e a COX-3 é uma enzima muito abundante no córtex cerebral e coração^{14,22}.

Embora aproximadamente 60% homólogas, com peso molecular cerca de 70kD, e com mecanismos similares de metabolização do ácido araquidônico^{56,110}, as isoformas COX-1 e COX-2 apresentam algumas diferenças. O sítio de ligação do agente inibidor na isoforma COX-2 é estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1⁵⁶, apresentando também local de ligação secundário, além do sítio catalítico. Isto tem permitido o desenvolvimento de agentes que bloqueiam a atividade COX-2, de maneira preferencial ou seletiva especificamente em concentrações que apresentam

---

efeitos menores sobre a COX-1. O mesmo medicamento pode funcionar como um inibidor da COX-2 em baixas concentrações e inibidor competitivo da COX-1 quando em altas dosagens⁷⁰. Diante de quadros inflamatórios, a atividade da isoforma COX-1 não parece ser alterada ou apresenta um aumento discreto de 2 a 4 vezes na sua expressão¹¹⁰. A COX-2 é constitutivamente expressa em pequenas quantidades em determinados tecidos como cérebro, intestinos, rins, testículos, endotélio vascular, glândula tireóide e pâncreas⁹ diante de quadro inflamatório, sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes¹¹⁰.

A expressão da COX-2 *in vitro* é induzida por citocinas pró-inflamatórias, mitógenos e LPS^{56,115}. Sua relevância tem sido sugerida no câncer, pois a COX-2 catalisa a síntese de prostaglandinas, as quais têm papel determinante na progressão dos tumores por induzir a formação de novos vasos^{19,42,47,56,117}. Expressão aumentada de COX-2 também tem sido implicada na doença de Alzheimer, artrite reumatóide, psoríase além de algumas condições neurológicas^{29,52,70,75,110,118}.

As prostaglandinas são potentes mediadores numa ampla variedade de respostas fisiológicas e patológicas, que variam desde a proteção renal e da mucosa gástrica até a coagulação sangüínea, inflamação e dor^{27,78,86}. Atualmente estão disponíveis antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) que podem inibir a enzima COX-2 preferencialmente ou seletivamente, ao contrário dos AINES tradicionais que inibem também a COX-1, sendo estes últimos responsáveis por efeitos colaterais deletérios que incluem ulceração gastrintestinal e sangramento, danos renais e disfunção plaquetária^{76,79,126,131}.

A prostaglandina E₂ tem sido implicada tanto na reabsorção óssea local da inflamação quanto na reabsorção sistêmica e como um mediador crucial na

---

patogênese das doenças periodontais^{11,21,80,82,86}. Ela induz vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular, resultando em sinais clínicos da inflamação, tais como edema e eritema^{79,92,98,125,131}. A PGE₂ está elevada em locais inflamados e periodotalmente doentes e em tecidos pulpare sintomáticos em comparação com locais-controle^{25,48,69}. A literatura tem mostrado que tecidos afetados pela doença periodontal inflamatória contêm níveis mais elevados de PGE₂ que tecidos periodontalmente saudáveis^{11,21,50,80-82,92,98}.

Suportando esses achados, tem sido relatado que os níveis de PGE₂ no fluido do sulco gengival de pacientes com periodontite estão correlacionados com a gravidade da doença medida por perda de inserção¹²¹. Na periodontite experimentalmente induzida em animais, TUBB *et al.* (1990)¹²³, relataram que os níveis de PGE₂ no fluido do sulco gengival aumentaram de maneira concomitante com o tempo em que houve perda de inserção periodontal. TSAI *et al.* (1998)¹²¹ mediram os níveis de PGE₂ no fluido do sulco gengival e estabeleceram que o nível de PGE₂ pode ser utilizado como um indicador da destruição periodontal. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse mediador também é um potente estimulador da síntese de metaloproteinases por monócitos e fibroblastos, resultando em destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea mediada por osteoclastos^{12,16}. BEZERRA *et al.*, em 2000¹¹, estudaram o efeito do meloxicam para inibir a síntese de PGE₂ utilizando o modelo de indução da doença periodontal inflamatória experimental em ratos, tendo sido relatada diminuição acentuada da reabsorção do osso alveolar. Com este propósito, outros autores passaram, então, a estudar a relação entre os antiinflamatórios, PGE₂ e doença periodontal inflamatória. Como o mecanismo

de ação dessas drogas é bloquear a síntese de PG por meio da inibição da COX, sugere-se, portanto, que essa enzima e seus produtos, principalmente a PGE₂, tenham papel importante na doença periodontal inflamatória^{50,54,55,80,82,98}.

Vários estudos relatados têm mostrado presença elevada de PGE₂ em tecidos gengivais inflamados, o que pode ser explicado por um aumento local na expressão da COX-2^{10,11,21,50,80-82,92}. Relatos recentes mostram um aumento da expressão de RNAm para a COX-2 e dos níveis da proteína, com aumento da formação de PGE₂, em fibroblastos gengivais após exposição *in vitro* à interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α ou LPS⁸⁵⁻⁸⁷. Resultados semelhantes de aumento da expressão da COX-2 também foram observados em leucócitos, num modelo de inflamação induzida experimentalmente por periodontopatógeno^{59,79,87,97,129}. Outro trabalho realizado por LOHINAI, em 2001⁷¹, utilizando também modelo de indução da doença periodontal inflamatória em ratos, mostrou aumento da expressão da COX-2 no tecido mucogengival ao redor da área afetada pela doença periodontal inflamatória. Além disso, o tratamento dos animais com um inibidor preferencial da COX-2 (NS-398) reduziu o extravasamento de plasma e a reabsorção óssea, sugerindo que essa enzima seja induzida na periodontite, desempenhando um papel importante na inflamação gengival e na destruição do osso alveolar⁷¹.

A contribuição da COX-2 para a doença periodontal inflamatória ainda precisa ser estabelecida com precisão. A administração de agentes farmacológicos ativos locais ou sistêmicos, que inibem a COX-2, pode ser um método útil para se investigar o papel da COX-2 nas doenças inflamatórias. Sabe-se que o aumento da expressão de COX-2 está associado com a progressão da doença periodontal inflamatória, envolvendo destruição de todo

---

o tecido conjuntivo e reabsorção óssea^{10,11,21,50,80-82,92,98}. Contudo, as vias de ativação da COX-2 nesta doença ainda não foram completamente esclarecidas.

1.4 - FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E INFLAMAÇÃO

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também conhecido como fator de permeabilidade vascular é um mitógeno bastante específico para células endoteliais vasculares. Funciona como um potente fator indutor de angiogênese para células endoteliais em vasos recém-formados. É o maior regulador tanto da neovascularização fisiológica quanto da patológica^{18,53,63,67,95,116}.

O VEGF funciona como regulador da permeabilidade vascular, que é considerada importante para o início da angiogênese. A sobrevivência de células endoteliais nos vasos recém-formados é dependente do VEGF. Coerente com seu papel na sobrevivência celular, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais^{34,37,63,116}.

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa, básica e ligada à heparina. A família VEGF atualmente inclui seis membros conhecidos como os VEGF ligantes: VEGF-A, fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E^{35,38,130}. Os membros da família são glicoproteínas diméricas secretadas, que contêm resíduos característicos de oito cisteínas espaçadas. A porção de adesão ao receptor da molécula de VEGF é formada por uma porção homodimérica antiparalela do VEGF covalentemente ligada por duas pontes dissulfídicas^{33,35,36}.

O gene de VEGF produz múltiplas espécies de RNAm. Isto determina a codificação de diferentes isoformas protéicas de VEGF com subunidades polipeptídicas de 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos. O VEGF₁₆₅ é a espécie molecular predominante e a principal isoforma, mas transcrições que codificam o VEGF₁₈₉ são também comumente encontradas em células que expressam o gene VEGF^{35,130}. Em contraste, o VEGF₂₀₆ é uma forma rara. VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ são formas mais básicas e se ligam à heparina com maior afinidade do que o VEGF₁₆₅. VEGF₁₆₅ é secretado, embora uma fração significativa se mantenha ligada à superfície e à matriz extracelular. Entretanto, o VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ estão quase que completamente seqüestrados na matriz extracelular. O VEGF₁₄₅ é a maior variante encaixada de várias linhas celulares tumorais originadas de órgãos reprodutores femininos. VEGF₁₂₁ é uma proteína livremente difusível⁹⁶. Entretanto, essas isoformas podem ser liberadas numa forma solúvel pela heparina ou heparinase, o que sugere que a área de adesão é representada por proteoglicanos que contêm moléculas do tipo heparina. As formas mais longas podem ser liberadas pela plasmina seguida da clivagem na terminação-COOH. Essa ação cria um fragmento proteolítico bioativo que tem um peso molecular de aproximadamente 34 kDa^{38,130}. Tem sido demonstrado que a ativação de plasminogênio e a geração de plasmina exercem um importante papel na cascata angiogênica. As proteínas do VEGF podem tornar-se disponíveis para as células endoteliais por, pelo menos, dois mecanismos diferentes: como proteínas livremente difusíveis (VEGF₁₆₅ e VEGF₁₂₁) em seguida à ativação da protease, ou com a clivagem das isoformas mais longas^{32,130}.

Além disso, há evidências científicas da identificação de receptores tirosina quinases com propriedades sinalizadoras para o VEGF, o VEGFR-1 (conhecido como Flt-1), e o VEGFR-2 (KDR/Flk-1), os quais dividem aproximadamente 44% de aminoácidos homólogos^{38,130}. O VEGF-C e o VEGF-D se ligam a um terceiro receptor, VEGFR-3 (Flt-4), que não reconhece o VEGF-A. O VEGF-C e o VEGF-D também se ligam ao VEGFR-2, porém com menor afinidade, em comparação ao VEGFR-3¹³⁰. PlGF e VEGF-B se ligam com alta afinidade apenas ao VEGFR1, enquanto que o VEGF-E se liga especificamente ao VEGFR-2^{38,130}.

O papel crítico do VEGF nos organismos é notavelmente demonstrado em camundongos deficientes de VEGF. A perda de um simples alelo do VEGF leva à morte intra-uterina desses camundongos¹⁹. Elevados níveis de VEGF têm sido detectados durante a fase de granulação da cicatrização e estão presentes em tecidos com células endoteliais inativas, confirmando a importância do VEGF em potencializar a angiogênese numa variedade de tecidos, respondendo a diversos sinais^{58,84}. Entretanto, numerosas questões básicas ainda estão incompletamente respondidas ou mesmo sem resposta. Há fortes evidências de que as ações do VEGF no endotélio vascular são complexas e de forma nenhuma limitadas à indução do crescimento. Estudos recentes têm enfatizado o papel do VEGF no crescimento celular endotelial, na prevenção da apoptose de células endoteliais e na formação vascular colateral^{32,34,58,88,119}.

Um vasto número de células, incluindo plaquetas, leucócitos e neutrófilos, pode secretar o fator de crescimento endotelial vascular⁷⁷, imprescindível para um correto desenvolvimento embrionário e para

---

progressão de outras condições fisiológicas e patológicas, incluindo reparo tecidual, artrite reumatóide, neovascularização ocular, progressão tumoral, endometriose e doenças cardiovasculares^{17,103}.

Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF pode ser um mediador importante na doença periodontal inflamatória, possivelmente pela expansão vascular e progressão da inflamação^{58,116}. Adicionalmente, sabe-se que o aumento na expressão de VEGF em alguns processos patológicos ocorre via PGE₂⁵⁸. Outros relatos documentam que a COX-2 é a enzima responsável pela produção PGE₂ na doença periodontal inflamatória^{11,71}. A literatura também documenta que a inibição da atividade da COX-2 diminui significativamente a expressão de VEGF, inibindo a angiogênese em tumores^{35,44,95}. Porém, não há evidências na literatura da expressão simultânea de COX-2 e VEGF nos tecidos afetados pela doença periodontal inflamatória. Dessa forma, justifica-se a realização de investigações adicionais para que esses aspectos sejam esclarecidos.

1.5 - MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA DOENÇA PERIODONTAL INFLAMATÓRIA EXPERIMENTAL

O estudo da doença periodontal inflamatória requer o uso de animais de laboratório para os testes de agentes terapêuticos e para a avaliação da segurança e eficiência de técnicas, drogas e ferramentas para a melhora da cicatrização. Pelo fato da doença periodontal resultar em inflamação, a indução em humanos não representa um procedimento ético. Portanto, os modelos animais, nos quais a doença periodontal inflamatória é induzida experimentalmente, continuarão indispensáveis para o estudo desta doença. A

---

facilidade de manejo, o custo relativamente baixo e o curto período de tempo de estudo fazem do rato um instrumento versátil para estudo da doença periodontal inflamatória⁷².

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não têm correspondentes em outras espécies, a doença periodontal inflamatória é comum no reino animal. Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à doença periodontal inflamatória^{92,123}. É importante ressaltar, porém, que a anatomia da junção dentogengival da região de molares de rato é muito semelhante àquela descrita no homem, tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nesses animais uma ferramenta bastante válida^{11,72}. Em ratos, esta doença pode ser induzida por meio de manipulação dietética⁶², da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos^{62,72,87} e, ainda, por meio de colocação de ligaduras ao redor da região cervical do molar do animal, geralmente o primeiro molar superior ou inferior, que funcionam como sítio para colonização bacteriana^{1,10,11,28,50,54,55,68,82,105}.

A irritação mecânica local e a promoção da formação de biofilme dentário pela colocação de ligadura com fio de seda ou algodão ao redor da região cervical dos primeiros molares inferiores, tem sido a técnica mais amplamente utilizada na indução da doença periodontal inflamatória experimental^{1,10,11,28,50,54,55,68,82,102}. Apesar da localização subgengival da ligadura e de sua associação com agregados e biofilmes, um revestimento epitelial inicialmente bem definido a separa do tecido conjuntivo subjacente. A partir de então, em resposta à agressão mecânica e ao acúmulo gradualmente

---

mais exuberante do biofilme ao redor da ligadura, ocorrem períodos de inflamação aguda, com migração de células inflamatórias, seguidos por perda de tecido conjuntivo e períodos de inflamação crônica, caracterizando a instalação da doença periodontal inflamatória^{54,55}. Uma vez definido o método de indução da doença periodontal inflamatória experimental, uma série de estudos pode ser realizada com relação à sua patogênese, evolução e terapêutica.

PROPOSIÇÃO

---

2. PROPOSIÇÃO

Levando-se em consideração evidências recentes que sugerem ser o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) um mediador importante na doença periodontal inflamatória, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) avaliar a perda óssea e o efeito do meloxicam, inibidor preferencial da COX-2, nos tecidos periodontais durante a progressão da doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos;
  - 2) investigar a cinética de expressão de RNAm para COX-2, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 nos tecidos periodontais durante a progressão da doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos, farmacologicamente tratados ou não com meloxicam, inibidor preferencial da COX-2;
  - 3) investigar a cinética de expressão da proteína VEGF nos tecidos periodontais durante a progressão da doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos, farmacologicamente tratados ou não com meloxicam, inibidor preferencial da COX-2.
-

MATERIAL E

MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e caracterização dos grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 200 e 250 g (aproximadamente 60 dias), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo (FOB/USP), divididos em dois grupos:

GRUPO 1- Animais submetidos à indução da doença periodontal por ligadura, sem tratamento farmacológico.

GRUPO 2 - Animais submetidos à indução da doença periodontal por ligadura, e tratados com inibidor preferencial da COX-2 (Meloxicam, 3 mg/kg/dia)¹¹, via intraperitoneal.

3.2 - Indução experimental de doença periodontal inflamatória por meio da colocação de ligadura

A manipulação animal seguiu o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da FOB/USP (processo nº.17/2004). Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, 60 mg/kg, via intraperitoneal).

A ligadura constituiu-se de fio de seda preta 3-0 estéril e foi colocada na região cervical do primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial^{11,71,102}. Os dentes contralaterais foram utilizados como controle (tecido sadios) (Figura 1). Os animais foram

---

mantidos no biotério da FOB/USP e alimentados com ração normal e água *ad libitum*.

Figura 1 – Sequência da colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior. O nó foi mantido na região mesial e o fio inserido em todas as faces do dente.

3.3 – Obtenção de espécimes para os diferentes experimentos e número de animais

Para o acompanhamento da progressão da doença periodontal inflamatória, os animais foram sacrificados nos tempos de 3, 7, 14 e 30 dias após a colocação da ligadura, por meio de dose excessiva de anestésico, procedendo-se à obtenção de espécimes para os diferentes experimentos.

A mandíbula foi removida, preservando-se o tecido gengival, sendo, então, separada em duas hemimandíbulas. O material destinado à análise microscópica e imunohistoquímica foi fixado em Formol 10%, por 24 h e desmineralizado em solução de EDTA 5%, aproximadamente, durante 45 dias. Os espécimes foram seccionados, resultando em cortes vestibulo-linguais. Em seguida, foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo (Leica) com espessura de 5 μ m, sendo aderidos em lâminas de vidro comuns para microscopia (Corning®).

Para avaliação da perda óssea alveolar, as hemimandíbulas foram tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 50% em água, por 24 horas, para remoção dos tecidos moles, lavado em seguida com PBS 1x e deixado para secar a temperatura ambiente. O material foi então imerso em azul de metileno 1%, por 5 minutos. Em seguida, fotografado em lupa de dissecação, com aumento de 20x (Zeiss), com a face oclusal dos molares posicionada perpendicularmente a base da lupa. Para cada animal, a perda óssea foi definida como a média da área total entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar.

Para os outros experimentos, imediatamente após a morte dos animais, os tecidos gengivais circundando os primeiros molares inferiores foram acondicionados em tubos de microcentrífuga e congelados na temperatura de -80°C (Figura 2), para realização posterior de experimentos envolvendo as técnicas de RT-PCR e Western Blot .

Figura 2 – Delimitação da área a ser analisada, correspondente a uma faixa de tecido gengival, que circundava o primeiro molar e cerca de metade do segundo molar inferior.

Com relação ao número de animais utilizados, para cada um dos 4 tempos de avaliação da progressão da doença periodontal inflamatória (3, 7, 14 e 30 dias) foram incluídos 15 animais. Portanto, foi utilizado um total de 120 animais, sendo 60 no grupo 1 (sem tratamento com meloxicam) e 60 no grupo 2 (tratados com meloxicam). Cinco animais foram aleatoriamente utilizados para obtenção dos espécimes para cada uma das técnicas estudadas: RT-PCR, Western blot e imunohistoquímica. Vale ressaltar que os animais utilizados como fonte para a análise microscópica com coloração hematoxilina-eosina (HE) também foram utilizados para os testes de imunohistoquímica.

3.4 – Análise microscópica

As lâminas de vidro contendo os cortes vestibulo-linguais das amostras foram coradas com HE para a análise microscópica geral e grau de reabsorção óssea. Esta análise morfológica foi descritiva e incluiu parâmetros microscópicos quanto à distribuição e tipo de infiltrado inflamatório; presença de reabsorção dentária, efeito do meloxicam na reabsorção óssea alveolar e presença de biofilme dentário.

3.5 - Extração de RNA total das biópsias de tecido gengival

Para a realização destes experimentos, seguimos as descrições feitas em publicações do nosso laboratório¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Logo após a remoção, os tecidos gengivais foram imediatamente colocados em tubos de centrífuga contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) (0,1 g de tecido/1,0 mL de Trizol) e congelados a -80°C até o momento da extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. No momento oportuno, os tubos foram descongelados e os tecidos homogenizados utilizando-se um homogenizador de tecidos. Em seguida, os tubos foram incubados por 5 min a 4°C e então foi adicionado um volume de 20% de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso a 4°C por 5 min, sendo em seguida centrifugados a 12.000 g por 25 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 400 μL que foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 400 μL de isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso a 4°C por 15 min. Após centrifugação a 15.000 g por 20 min a 4°C , o precipitado de RNA foi obtido e

---

em seguida o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1 mL de etanol 70% em água com dietil pirocarbonato 0,1% (DEPC), agitando-se vigorosamente. Foi realizada centrifugação a 15.000 g por 10 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra centrifugação com 1 mL de etanol 70% a 15.000 g por 10 min a 4°C. Para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, os tubos de microcentrífuga receberam um volume de 50 µL de água tratada com DEPC 0,1% e foram incubados a 65°C por 15 a 30 min até a dissolução dos precipitados.

3.6 - Quantificação do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: $(\text{RNA}) = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição conhecido}$, sendo o resultado expresso em $\text{mg/mL}^{106-108}$.

3.7 - Avaliação da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada pela diluição do RNA (em Tris-HCl 10 mM, pH 7,8) e leitura da absorbância em cubetas de quartzo em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260} e A_{280}). Foi calculada a relação A_{260}/A_{280} , a qual foi considerada aceitável

---

se estivesse entre 1,9 e 2,1, pois valores nesse intervalo indicam ausência de DNA na amostra.

3.8 - Tratamento do RNA total com DNase

Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído de diferentes tecidos e células por DNA genômico, foi realizado tratamento de todas as amostras com DNase (RQ1 RNase – Free DNase®, Promega Corporation). Aliquotas volumétricas diferentes foram utilizadas para a obtenção de uma quantidade padronizada de 2 µg de RNA total em cada amostra do estudo. A quantidade final de 2 µg de RNA total foi tratada com 2 U de DNase. Em cada tubo de microcentrifuga foi adicionado 1 µL do tampão específico para este tipo de reação (RQ1 RNase-Free 10X Reaction Buffer®, Promega Corporation). Todos os tubos foram incubados a 37°C durante 30 min. Posteriormente, com o objetivo de cessar a reação, foi adicionado um volume de 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution® (Promega Corporation) em cada amostra, de acordo com as instruções do fabricante. Para finalizar o procedimento de tratamento com DNase, cada tubo foi incubado a 65°C por 10 min. As amostras de RNA total tratadas com DNase foram mantidas a –80°C até o momento oportuno de uso.

3.9 - Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para a realização destes experimentos, também seguimos as descrições feitas em publicações do nosso grupo^{8,107,108}. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada num volume de reação de 15 µL

---

utilizando-se 2 µg de RNA total, 0,2 µg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH8,3; KCl 68 mM e MgCl₂ 9 mM), soroalbumina bovina 0,08 mg/mL, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 U de transcriptase reversa. Todos os reagentes citados fazem parte do “First-strand cDNA synthesis kit” (Amersham Pharmacia, Estados Unidos). cDNA foi sintetizado durante um período de 60 min de incubação a 37°C e a reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min. Os produtos da RT (3 µL) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume de 50 µL em tubos Hot start com os seguintes reagentes: 20 pmol (0,4 µM) de cada primer (sense e anti-sense para cada alvo; Tabela 1), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM e MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs 0,2 mM e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Go Taq® DNA Polymerase, Promega). O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 2 min a 94°C seguida de 30-40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação, anelamento e extensão, sendo os tempos e temperaturas de cada fase padronizados de acordo com os primers utilizados^{47,106-108,112}. Como controle positivo foi utilizado primer para β-actina^{102,107,108}. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo. Para cada par de primers foi realizada PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação dos primers (controle negativo água). Um novo controle negativo foi realizado para cada amostra de tecido, utilizando-se RNA como molde de PCR para avaliação de possível contaminação por DNA genômico (no-RT). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese horizontal, em gel de agarose

---

a 2% contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador com intervalos de peso molecular igual a 100 pb. O cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados. Nesse momento foi realizada fotodocumentação (câmera Sony V1, zoom óptico de 4X, distância padrão de 21 cm do centro do gel; filtro Kodak UV).

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação.

Alvo	Tamanho antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
<i>β-actina</i>	351 pb	AACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTT	AGCAGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC
<i>COX-2</i>	253 pb	TGGTGCCGGGTCTGATGATG	GCAATGCGGTTCTGATACTG
<i>VEGF₁₆₅</i>	80pb	ATCATGCGGATCAAACCTCACC	GGTCTGCATTACATCTGCTATGC
<i>VEGFR-1</i>	83 pb	CGACACTCTTTTGGCTCCTTCTAA	TGACAGGTAGTCCGTCTTTACTTCG
<i>VEGFR-2</i>	92 pb	GTACCAAACCATGCTGGATTGC	CTTGCAGGAGATTTCCCAAGTG

3.10 - Estudo da intensidade de expressão de RNAm

Em cada amostra de tecido gengival, foi realizada análise semi-quantitativa, utilizando-se como parâmetro de comparação os valores de intensidade obtidos para a *β-actina*, proteína cujo gene é expresso constitutivamente, inclusive no modelo experimental estudado¹⁰². Para esta análise, foi empregado o software Scion Image® (Scion Corporation, Frederick, Maryland, E.U.A.). Para cada amostra foi obtida uma relação entre a

intensidade da banda alvo (COX-2, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2) e a da banda de β -actina no gel de agarose. Esta relação foi posteriormente utilizada para os estudos de correlação entre a expressão dos RNAm alvo e o estado de saúde dos tecidos periodontais.

3.11 - Western Blot

Para estes experimentos foi utilizado o protocolo padronizado por AMARAL *et al.*²⁻⁴. Biópsias de tecido gengival foram descongeladas e homogenizadas com homogenizador em solução de isolamento de proteína (PIS) contendo sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 0,1 mM e fosfato de potássio 5 mM, pH 7,7. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. Foram utilizados 20 μ g de proteína total de cada amostra e as mesmas foram eletroforéticamente separadas por tamanho, usando-se sistema de gel de poliacrilamida 12%. A solução tampão consistiu de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,5%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em voltagem de 60V, 15 min e 120V, 60 min. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (100 V por 1 h) em tampão que consistiu de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, metanol 20%, pH 8,3. As membranas foram lavadas em solução salina tamponada por Tris (TBS), bloqueada com leite seco sem gordura 5% em TBS por 2 h. Em seguida, incubadas no anticorpo primário contra VEGF₁₆₅ humano produzido em camundongo (Pharmingen) (com reatividade cruzada para rato - diluição 1:1000), ficando por toda a noite em

---

temperatura de 4°C. As membranas foram então lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotinilado contra IgG de camundongo produzido em cabra (Biorad) (diluição 1:500) ficando por 1,5 h. A detecção do sinal foi realizada com luminescência química aumentada (ECL Plus, Amersham Pharmacia, Estados Unidos) e as membranas foram expostas a filme de radiografia. Todos os experimentos de Western Blot foram realizados no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru.

3.12 - Análise Imunohistoquímica

Cortes de 5µm de espessura foram obtidos em lâminas silanizadas e colocados na estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Em seguida, acomodadas em cubas de “Coopler” com ranhuras, passando por três banhos de xilol, dois banhos de etanol absoluto e um de álcool 95%, 5 min cada. Depois as lâminas foram lavadas e deixadas em dois banhos de solução salina tamponada por fosfato (PBS) pH=7,2, por 5 min. Foram transferidas para bandejas, onde foi gotejado e aspirado mais PBS, para depois gotejar peróxido de hidrogênio 3%, para bloqueio da peroxidase endógena, por 15 min. Em seguida foram lavadas em PBS, aspiradas, sendo então gotejados os bloqueadores de proteínas livres do soro e lavadas em PBS novamente. Para a recuperação dos epítomos das proteínas os cortes foram submetidos a aquecimento em solução de tampão citrato de sódio 10 mM. Após recuperação antigênica, os cortes foram lavados em PBS e o excesso aspirado. O anticorpo primário contra VEGF₁₆₅ humano produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology Inc) (diluição 1:250) foi gotejado sobre

---

as lâminas ficando em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS e aspirados para receber o anticorpo secundário biotinilado (diluição 1:100) (Dakocytomation LSAB®2 Kit), ficando por 15 min em temperatura ambiente e depois lavados com PBS 3 vezes e incubados na solução de streptavidina-peroxidase por 15 min. Para controle negativo, um dos cortes foi incubado com soro normal de coelho (diluição 1:1000) no lugar do anticorpo primário. Após a exposição à solução de streptavidina-peroxidase as lâminas foram lavadas com PBS, sendo aspirado o excesso, para depois ser gotejada a solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, Dakocytomation) por 5 min. As lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas por Hematoxilina de Harris 5% por 1 min. Em seguida as lâminas foram transferidas para as cubas de "Coopler" e passadas rapidamente por três banhos de álcool etílico absoluto e três de xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina sintética Entelan® (Merck).

3.13 – Análise estatística

3.13.1 – Erro do método para medida de intensidade de bandas de PCR

Para estimar o valor do erro intra-examinador sistemático do método, a intensidade das bandas de metade da amostra foi novamente estudada, 30 dias após a análise inicial. O teste t pareado foi usado para analisar o erro intra-examinador sistemático do método, por meio da comparação dos valores da expressão de RNAm para os alvos em duplicata, obtidos em duas análises distintas com intervalo de 30 dias. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para estimar a viabilidade de utilização do método proposto.

3.13.2 – Análise estatística entre grupos e variáveis

Após a coleta, os dados foram devidamente analisados por meio de gráficos e tabelas, sendo utilizada ANOVA seguida do teste de Tukey para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. Além disso, o teste de Correlação de Pearson foi utilizado para observar a existência de correlação entre os alvos estudados. Todos os testes foram realizados com o programa SIGMASTAT 2.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), tendo sido adotado nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

***R**ESULTADOS*

4. RESULTADOS

4.1 – Observação Macroscópica Clínica

A observação macroscópica clínica descritiva dos primeiros molares inferiores direitos e de seus tecidos periodontais adjacentes revelou grande quantidade de biofilme aderida aos dentes com ligadura, tornando-se cada vez mais exuberante com o aumento do tempo de indução experimental (Figura 3). Os aspectos inflamatórios do tecido gengival, como aumento volumétrico e sangramento apresentaram-se em diferentes intensidades. Após 3 dias de indução, observou-se aumento volumétrico e sangramento, especialmente na região vestibular. Somente notou-se sangramento significativo e mobilidade dentária ao toque, utilizando-se instrumento sem ponta ativa, a partir de 7 dias de indução experimental. Após o sacrifício dos animais, observou-se a progressão da doença periodontal inflamatória e o efeito do meloxicam na perda óssea alveolar (Figura 4).

Figura 3 – Progressão da doença periodontal inflamatória com grande quantidade de biofilme, tornando-se cada vez mais exuberante com o tempo de indução experimental.

Figura 4 – Ilustração macroscópica da progressão da doença periodontal inflamatória e a perda óssea alveolar.

4.2 – Análise microscópica dos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE)

4.2.1 – Tecidos periodontais sadios

A estrutura e organização dos tecidos periodontias normais dos molares dos ratos foram observadas a partir das amostras controle obtidas do lado oposto à colocação da ligadura. O quadro histomorfológico exibiu epitélio juncional com sua extremidade apical na altura do limite amelocementário, apresentando de duas a três camadas de células e superfície não queratinizada (Figura 5a-b). Em direção coronária, o epitélio aumentou gradualmente de espessura decorrente do aumento no número de camadas celulares até o limite com o epitélio do sulco. O epitélio sulcular mostrou-se pavimentoso estratificado paraqueratinizado e em continuidade com a mucosa gengival revestida por epitélio pavimentoso estratificado com espessa camada córnea. Subjacente, aos tecidos epiteliais, o tecido conjuntivo que constitui a lâmina própria mostrou-se composto por fibras colágenas delgadas, pequeno vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN), muitas vezes também presentes no interior do epitélio juncional e sulcular (Figura 5b-c). Lateralmente, a superfície dentária mostrou-se revestida pelo cemento e nos planos mais profundos por feixes de fibras colágenas semelhantes às fibras principais do ligamento peiodontal (Figura 5d).

O periodonto de sustentação composto pelo cemento, ligamento periodontal e o osso alveolar exibiu características de normalidade, ou seja, a superfície cementária mostrou-se uniforme e regular, revestida por cementoblastos e raríssimas áreas de reabsorção dentária paralisada e/ou de superfície irregular, demarcada por uma linha de reversão basofílica revestidas

---

por células poliédricas justapostas, sendo caracterizada a reabsorção como reparada (Figura 5a). O ligamento periodontal exibiu espessura uniforme e grande celularidade, com fibroblastos de morfologia fusiforme e dispostos em fascículos (Figura 5c). As fibras colágenas arranjavam-se paralelamente entre si e se inseriam perpendicularmente às superfícies ósseas e cementárias, sendo permeadas por inúmeros vasos sanguíneos, com raríssimas células inflamatórias, compatível com a normalidade. A crista óssea alveolar mostrou-se arredondada e próxima ao nível da junção amelocementária, sua superfície apresentava revestida por osteoblastos justapostos e em paliçada, com raras áreas de reabsorção por osteoclastos, provavelmente relacionadas com a homeostasia tecidual requerida pela dinâmica do espaço periodontal (Figura 5a).

No período de 30 dias, nos tecidos periodontais normais não submetidos à colocação de ligadura, observou-se aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria do epitélio da papila interdentária (Figura 6a-c) caracterizado pela presença de inúmeros neutrófilos e macrófagos, porém delimitado pela presença física das densas fibras colágenas do ligamento gengival, não comprometendo as estruturas do periodonto de sustentação (Figura 6d). Com relação ao suporte ósseo, o processo alveolar estava bem preservado com a crista óssea alveolar apresentando-se arredondada e a superfície óssea periodontal predominantemente revestida por osteoblastos.

Figura 5 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado oposto a indução experimental no período de 7 dias: a) visão panorâmica mostrando a papila interdentária (seta larga azul), com o epitélio juncional próximo a junção amelodentinária (seta vazada), cimento (C) uniformemente recobrendo toda a dentina radicular (D), osso alveolar (O) íntegro com a crista arredondada na altura da junção amelodentinária (seta vazada) e as densas fibras do ligamento peridontal (LP) inserindo-se ao osso alveolar (O) e ao cimento (C); b) detalhe da papila interdentária mostrando o epitélio juncional próximo a junção amelodentinária (seta vazada) e o epitélio (E) sobreposto ao tecido conjuntivo (TC) da lâmina própria, ricamente celularizado e vascularizado; c) detalhe da figura anterior mostrando algumas células inflamatórias (seta azul) no interior do tecido conjuntivo (TC) e do epitélio (E); detalhe do ligamento periodontal (LP) característico da região inserido ao cimento (C) e ao osso alveolar (O). HE

Figura 6 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado oposto a indução experimental no período de 30 dias: a) visão panorâmica mostrando a papila interdentária (seta larga azul), com o epitélio juncional próximo a junção amelodentinária (seta vazada), cimento (C) uniformemente recobrendo toda a dentina radicular (D), osso alveolar (O) íntegro com a crista arredondada na altura da junção amelodentinária (seta vazada) e as densas fibras do ligamento peridontal (LP) inserindo-se ao osso alveolar (O) e ao cimento (C); b) detalhe da papila interdentária mostrando o epitélio juncional próximo a junção amelodentinária (seta vazada) e o epitélio (E) sobreposto ao tecido conjuntivo (TC) com inúmeras células inflamatórias (seta azul) e vasos sanguíneos (V); c) detalhe da figura anterior mostrando algumas células inflamatórias (seta azul) no interior do tecido conjuntivo (TC) e do epitélio (E); detalhe do ligamento periodontal (LP) característico da região inserido ao cimento (C) e ao osso alveolar (O) . HE

4.2.2 – Tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme por meio da colocação de ligadura em ratos não tratados com meloxicam

A análise microscópica dos tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme por meio de colocação de ligadura revelou variações entre os diferentes períodos de indução (3, 7, 14 e 30 dias).

Observou-se reabsorção óssea a partir do 3º dia após a colocação da ligadura. Notou-se proliferação vascular e reabsorção do osso alveolar de suporte, especialmente a partir do 7º dia, quando a inflamação atingiu, mais evidentemente, o periodonto de sustentação, evoluindo para perda do suporte dentário, especialmente a partir do 14º dia. Nas amostras analisadas, a progressão da doença periodontal inflamatória não foi marcada tanto pelo aumento de intensidade do infiltrado inflamatório, mas pela grande perda óssea nas regiões mais profundas do tecido periodontal de suporte. A partir deste período, notou-se maior número de áreas de reabsorção do processo alveolar com perda de grande parte das estruturas necessárias para o suporte dentário. No 30º dia o nível de perda óssea foi tão grande que chegou a comprometer a sustentação do primeiro molar inferior, praticamente ausente na região mesial, acompanhado por marcante exposição de cimento.

A seguir, as avaliações foram expressas de forma descritiva e mais detalhadas, considerando cada período da indução da doença periodontal inflamatórias.

No período de 3 dias, a região interproximal apresentou agregados de biofilme, perda da papila interdentária com completa destruição dos tecidos

---

epiteliais compatível com o processo destrutivo e intenso exsudado inflamatório por PMNs que parecem migrar em direção a agregados de biofilme presentes na superfície dentária (Figura 7a). Na porção cervical, a região do ligamento periodontal apresentava inúmeros vasos hiperêmicos e congestionados, processo inflamatório exacerbado e destruição das fibras colágenas, além de inúmeras áreas de reabsorção óssea pelos osteoclastos, dando origem a inúmeros fragmentos ósseos envoltos por células inflamatórias, principalmente na porção cervical (Figura 7b-c)

Aos 7 dias, houve diminuição do rebordo ósseo devido à perda parcial do osso e do processo alveolar, ficando o terço cervical da raiz exposto ao meio externo e ao biofilme. Ocorreu o recobrimento da superfície por tecido epitelial hiperplásico, com inúmeras células inflamatórias e fragmentos ósseos seqüestrados (Figura 8a). Adjacente ao tecido epitelial, exacerbado infiltrado inflamatório predominantemente por PMNs preencheu toda a extensão do terço médio da raiz, em substituição às estruturas do periodonto de sustentação perdidas (Figura 8b-c). Neste período, eram nítidas as áreas de reabsorção, tanto dos tecidos dentários quanto do tecido ósseo. (Figura 8d).

Observou-se no período de 14 dias, que o tecido epitelial apresentou redução da hiperplasia e do número de células inflamatórias e formação de longas projeções epiteliais, algumas recobrando pequena superfície do cimento (Figura 9a-b). O processo inflamatório ficou mais restrito ao tecido conjuntivo adjacente ao tecido epitelial ou associado aos pequenos fragmentos ósseos (Figura 9c-d).

Aos 30 dias, o quadro histológico mostrou que o organismo conseguiu frear a exacerbada destruição tecidual, bloqueando o processo inflamatório

---

para a região cervical. O processo inflamatório mostrou-se com quantidade moderada de PMNs no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio (Figura 10a). Devido à diminuição da altura do rebordo ósseo toda região cervical e parte da região média da raiz se mostrou exposta ao meio externo e ao biofilme associado à ligadura, porém, sem sinais de reabsorção tanto do cimento quanto da dentina. Sinais de reabsorção dos tecidos dentários só foram observados na porção média e apical recoberta pelo tecido conjuntivo (Figura 10a-d).

Figura 7 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal inflamatória induzida em rato, sem tratamento com meloxicam, período de 3 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a junção amelodentinária (seta vazada), a região da papila interdentária (seta larga azul) com completa destruição dos tecidos epiteliais e da crista óssea alveolar (O) e intenso infiltrado inflamatório estendendo-se aproximadamente até o terço o médio da raiz, com destruição do ligamento periodontal (LP) e do osso e do processo alveolar (seta larga preta); b) detalhe da região da crista óssea alveolar mostrando reabsorção do tecido ósseo (O) por osteoclastos (seta preta) e vasos sanguíneos (V); c) detalhe do periodonto de sustentação no terço médio da raiz exibindo reabsorção do osso alveolar por osteoclastos (seta preta), processo inflamatório na região do ligamento periodontal (LP) e o cimento (C); d) detalhe da região do ligamento periodontal mostrando inúmeras células inflamatórias (seta azul), vasos sanguíneos (V) hiperêmicos e destruição das fibras do ligamento periodontal (LP). HE

Figura 8 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal inflamatória induzida em rato, sem tratamento com meloxicam, período de 7 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a junção amelodentinária (seta vazada) e a diminuição da altura do rebordo ósseo (O) devido a perda parcial do osso e do processo alveolar, ficando o teço cervical da raiz exposta. Presença de tecido epitelial hiperplásico recobrimdo o tecido conjuntivo (TC) com intenso infiltrado inflamatório estendendo-se até o terço médio da raiz, áreas de reabsorção (seta larga preta) da dentina (D) e presença do osso e do processo alveolar (O) e do ligamento periodontal (LP) somente na porção apical da raiz; b) detalhe do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC) subjacente com inúmeras células inflamatórias (setas azuis) e o seqüestro ósseo (O) no interior do epitélio (E), c) detalhe do tecido epitelial exibindo o fragmento ósseo (O) seqüestrado e as células epiteliais (cabeças de seta) envoltas por inúmeros PMNs (seta azul), c) detalhe mostrando a reabsorção dos tecidos dentários (seta larga preta), ausência do periodonto de sustentação e substituição por tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos (V) e células infamatórias. HE

Figura 9 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal inflamatória induzida em rato, sem tratamento com meloxicam, período de 14 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a região da junção amelodentinária (seta vazada) e a diminuição da altura do rebordo ósseo (O) devido a perda parcial do osso e do processo alveolar, ficando o topo cervical da raiz exposta. Ausência da papila interdentária e recobrimento da superfície por tecido epitelial (seta larga azul) não característico da região, com longas projeções epiteliais; b) detalhe do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC) subjacente com inúmeras células inflamatórias (setas azuis) e o sequestro ósseo (O) no interior do epitélio (E), c) detalhe do fragmento ósseo envolto por tecido epitelial (E) e células inflamatórias do tecido conjuntivo (TC), c) detalhe da região média-apical da raiz mostrando a crista óssea (O), o cimento (C), as fibras do ligamento periodontal (LP) e os vasos sanguíneos (V). HE

Figura 10 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal inflamatória induzida em rato, sem tratamento com meloxicam, período de 30 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a região da junção amelodentinária (seta vazada), a diminuição da altura do rebordo devido a perda do osso e do processo alveolar, ficando praticamente apenas o osso basal (O), exposição da superfície dentária com grande acúmulo do biofilme bacteriano (P) associado a ligadura (L), ausência da papila interdentária e recobrimento da superfície por tecido epitelial (seta larga azul) não característico da região isolando o biofilme bacteriano (P) do tecido conjuntivo (TC); b) detalhe do biofilme bacteriano (P) na superfície da dentina (D) exposta, associado a ligadura (L) e do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC), c) detalhe da área de reabsorção (cabeça de seta) da estrutura dentária (D), do tecido conjuntivo (TC) e tecido do epitelial (E), c) detalhe as células inflamatórias (setas azuis) e dos os vasos sanguíneos (V) no conjuntivo (TC) adjacente ao epitélio (E). HE

4.2.3 – Tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme por meio da colocação da ligadura em ratos tratados com meloxicam

A análise microscópica dos tecidos periodontais submetidos ao progressivo acúmulo de biofilme, por meio da colocação de ligadura, revelou variações morfológicas significativas entre os diferentes períodos de indução, semelhantes ao observado no grupo não tratado, porém, em menor velocidade e intensidade.

Observou-se no período de 3 dias, que a região interproximal apresentou agregados de biofilme, perda da papila interdentária com completa destruição dos tecidos epiteliais, compatível com o processo destrutivo e intenso exudado inflamatório por PMNs que parecem migrar em direção a agregados de biofilmes presentes na superfície dentária (Figura 11a). Na porção cervical, a região do ligamento periodontal apresentava alguns vasos hiperêmicos e congestos, processo inflamatório moderado com destruição parcial das fibras colágenas, além de áreas com reabsorção do osso e do processo alveolar pelos osteoclastos, dando origem a alguns fragmentos ósseos envoltos por células inflamatórias, na porção cervical (Figuras 11b-d).

Aos 7 dias, houve diminuição do rebordo ósseo devido à perda parcial do osso e do processo alveolar, ficando apenas uma pequena parte do terço cervical da raiz exposta ao meio externo e ao biofilme (Figura 12a). Neste período, diferentemente do que ocorreu no grupo não tratado, o tecido epitelial não se mostrou presente e o tecido conjuntivo com inúmeras células inflamatórias PMNs estava em íntimo contato com o biofilme dentário, além disso, eram nítidas as áreas de reabsorção por osteoclastos da crista óssea

---

alveolar e o processo inflamatório migrando para as regiões mais apicais do ligamento periodontal, indicando atraso nos eventos celulares com o uso de antiinflamatórios (Figura 12b-d).

No período de 14 dias, algumas camadas de células epiteliais (Figura 13a-b) desorganizadas, já recobriam a superfície do tecido conjuntivo frouxo. Este tecido conjuntivo apresentava inúmeras células inflamatórias e estava circundado pelas fibras dento gengivais que isolava o processo inflamatório dos demais tecidos periodontais. Com a diminuição da altura do rebordo ósseo devido à perda parcial do osso e do processo alveolar, observados nos períodos anteriores, pequena parte do teço cervical da raiz ficou exposta. A superfície do osso alveolar exibiu inúmeros osteoblastos volumosos, indicando processo de síntese de novo tecido ósseo (Figura 13c-d)

Aos 30 dias, o quadro histológico indicou que o organismo conseguiu frear a destruição tecidual, bloqueando o processo inflamatório para a região cervical. O processo inflamatório mostrou-se com moderada quantidade de PMNs no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio (Figura 14). Devido à pequena diminuição da altura do rebordo ósseo parte da região cervical da raiz apresentou-se exposta ao meio externo e ao biofilme associado à ligadura, porém, sem sinais de reabsorção tanto do cimento quanto da dentina.

Figura 11 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal Inflamatória induzida em rato, tratado com meloxicam, período de 3 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a junção amelodentinária (seta vazada), a região da papila interdentária (seta larga azul) com completa destruição dos tecidos epiteliais e da crista óssea alveolar (O) e intenso infiltrado inflamatório estendendo-se aproximadamente até o terço o médio da raiz, com destruição do ligamento periodontal (LP) e do osso e do processo alveolar (seta larga preta); b) detalhe dos fragmentos ósseos (O) envoltos por tecido conjuntivo e células inflamatórias PMNs (asteriscos); c) detalhe do periodonto de sustentação no terço médio da raiz exibindo reabsorção do osso alveolar por osteoclastos (seta preta), processo inflamatório na região do ligamento periodontal (LP) e o cimento (C); d) detalhe da região do ligamento periodontal mostrando inúmeras células inflamatórias (seta azul), vasos sanguíneos (V) hiperêmicos e a desorganização das fibras do ligamento periodontal (LP). HE

Figura 12 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal Inflamatória induzida em rato, tratado com meloxicam, período de 7 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a junção amelodentinária (seta vazada) e a diminuição da altura do rebordo ósseo (O) devido a perda parcial do osso e do processo alveolar por reabsorção por osteoclastos (seta larga preta), ficando pequena parte do teço cervical da raiz exposta. Ausência de tecido epitelial, com tecido conjuntivo (TC) em íntimo contato com o biofilme microbiano (P) e apresentando inúmeras células inflamatórias; b) observar o tecido conjuntivo próximo ao biofilme microbiano com inúmeras células inflamatórias (setas azuis) e ausência do tecido epitelial, c) detalhe reabsorção da crista óssea alveolar por osteoclastos (seta larga preta), c) detalhe do periodonto de sustentação apresentando reabsorção do osso alveolar (O) por osteoclastos, células inflamatórias (seta azul) e cimento (C) íntegro;. HE

Figura 13 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal Inflamatória induzida em rato, tratado com meloxicam, período de 14 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a região da junção amelodentinária (seta vazada) e pequena redução da altura do rebordo ósseo (O) devido a perda parcial do osso e do processo alveolar. Ausência da papila interdentária e recobrimento da superfície por tecido epitelial (seta larga azul) não característico da região, permeadas por inúmeras células inflamatórias, isolando o tecido conjuntivo do biofilme microbiano; b) detalhe do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC) subjacente com inúmeras células inflamatórias (setas azuis) circundadas pelas fibras dentogengival (F), c) detalhe dos inúmeros PMNs (setas azuis) de permissão as células epiteliais (cabeça de seta), c) detalhe do periodonto de sustentação mostrando a integridade do osso alveolar (O), das fibras do ligamento (LP), dos vasos sanguíneos (V) e do cemento (C). HE

Figura 14 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com doença periodontal Inflamatória induzida em rato, tratado com meloxicam, período de 30 dias após a indução: a) visão panorâmica mostrando a região da junção amelodentinária (seta vazada), a diminuição da altura do rebordo devido a perda do osso e do processo alveolar, ficando praticamente apenas o osso basal (O), exposição da superfície dentária com grande acúmulo do biofilme microbiano associado a ligadura (L), ausência da papila interdentária e recobrimento da superfície por tecido epitelial (seta larga azul) não característico da região isolando o biofilme microbiano do tecido conjuntivo (TC); b) detalhe do biofilme microbiano (P) na superfície da dentina (D) exposta, associado a ligadura (L) e do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC), c) detalhe do tecido epitelial (E) e do tecido conjuntivo (TC) subjacente com inúmeras células inflamatórias (setas azuis), d) detalhe do periodonto de sustentação próximo a crista óssea apresentando osso alveolar de superfície irregular com reinserção de algumas fibras colágenas (setas), fibras do ligamento periodontal (LP) em reorganização, os vasos sanguíneos (V) e o cimento (C) íntegro. HE

4.3 - Análise da expressão de RNAm

4.3.1 - RT-PCR

Inicialmente foi realizada a avaliação da intensidade da expressão de RNAm para o gene de expressão constitutiva β -actina. Para algumas amostras não se obteve sinal das reações de PCR para β -actina. Por suspeitar de degradação do RNA das referidas amostras, optou-se por removê-las. Portanto, a presente análise baseou-se somente na relação entre a intensidade das bandas alvo: COX-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2; e das bandas de β -actina.

O teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, relacionou os valores médios entre os níveis de condição periodontal, os períodos de indução da doença periodontal e a interação entre os grupos. Quando se avaliou a expressão de RNAm para VEGF observou-se no período de 14 dias diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e 2 ($p=0,023$). O grupo 2 (tratado com meloxicam) apresentou valores estatisticamente menores na expressão de RNAm para VEGF (Figura 15a-b).

Ao avaliar os receptores do VEGF, observou-se que o RNAm para VEGFR-1 (Figura 16a-b) e o VEGFR-2 (Figura 17a-b) estavam expressos em todos os períodos e grupos. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de RNAm para VEGFR-1 e VEGFR-2.

Figura 15a – Representação gráfica da expressão de RNAm para VEGF em relação ao RNAm para β -actina em tecidos afetados pela doença periodontal e seus respectivos controles, bem como os tecidos afetados pela doença periodontal em ratos tratados ou não com meloxicam ($n = 3-5$ em todos os períodos).

(*) diferença estatisticamente significativa entre tecido afetado pela DP x tecido afetado pela DP (meloxicam) ($p = 0,023$).

Figura 15b – Gel de agarose corado com brometo de etídio para observação dos produtos amplificados por RT-PCR a partir de 2 μ g de RNA total de tecido gengival obtido após indução da doença periodontal inflamatória em ratos. cDNA amplificado por PCR com *primer* específico para VEGF (80pb). Controle água = controle negativo; M = marcadores de peso molecular de 25 pb.

Figura 16a – Representação gráfica da expressão de RNAm para VEGFR-1 em relação ao RNAm para β -actina em tecidos afetados pela doença periodontal e seus respectivos controles, bem como os tecidos afetados pela doença periodontal em ratos tratados ou não com meloxicam ($n = 3-5$ em todos os períodos).

Figura 16b – Gel de agarose corado com brometo de etídio para observação dos produtos amplificados por RT-PCR a partir de 2 μ g de RNA total de tecido gengival obtido após indução da doença periodontal inflamatória em ratos. cDNA amplificado por PCR com *primer* específico para VEGFR-1 (83 pb). Controle água = controle negativo; M = marcadores de peso molecular de 25 pb.

Figura 17a – Representação gráfica da expressão de RNAm para VEGFR-2 em relação ao RNAm para β -actina em tecidos afetados pela doença periodontal e seus respectivos controles, bem como os tecidos afetados pela doença periodontal em ratos tratados ou não com meloxicam ($n = 3-5$ em todos os períodos).

Figura 17b – Gel de agarose corado com brometo de etídio para observação dos produtos amplificados por RT-PCR a partir de 2 μ g de RNA total de tecido gengival de rato obtido após indução da doença periodontal inflamatória. cDNA amplificado por PCR com *primer* específico para VEGFR-2 (92pb). Controle água = controle negativo; M = marcadores de peso molecular de 25 pb.

Com relação à expressão de RNAm para VEGF e COX-2, o teste de Correlação de Pearson mostrou correlação positiva ($R=0,80$) entre os dois alvos estudados na doença periodontal inflamatória (Figura 18).

Figura 18 – Representação gráfica da Correlação de Pearson para expressão de RNAm para VEGF e COX-2 em tecidos afetados pela doença periodontal inflamatória induzida em ratos não tratados com meloxicam.

4.4 - Análise da expressão da proteína VEGF

4.4.1 – Western Blot

Esta análise foi feita para detectar a intensidade da expressão da proteína VEGF. Para algumas amostras a quantidade de proteína que seria utilizada na reação foi insuficiente, assim sendo, optou-se por removê-las. Portanto, a presente análise baseou-se na relação entre a intensidade da banda alvo VEGF e da banda VEGF para controle positivo (rim de camundongo).

O teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, relacionou os valores médios entre os períodos de indução da doença periodontal dos grupos. Quando se avaliou a expressão da proteína VEGF foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o lado controle e o lado doença periodontal dos grupos 1 e 2, nos períodos de 3, 7 e 14 dias (Figura 19a-b). No período de 14 dias, no controle pós-transcrição, houve uma tendência de diminuição na expressão da proteína VEGF no grupo 2 (tratado com meloxicam), lado doença periodontal. No período de 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 19a - Representação gráfica da expressão da proteína VEGF (% do controle positivo) em tecidos afetados pela doença periodontal e seus respectivos controles, bem como os tecidos afetados pela doença periodontal tratados ou não com meloxicam (n = 3-5 em todos os períodos).

(*) diferença estatisticamente significativa em comparação com o respectivo tecido sadio.

(#) tendência de diferença estatisticamente significativa entre tecido afetado pela DP x tecido afetado pela DP (meloxicam) (p = 0,08).

Figura 19b – Revelação radiográfica dos produtos de Western Blot para observação da expressão da proteína VEGF a partir de tecido gengival de rato obtido após

indução da doença periodontal inflamatória, no período de 14 dias. A membrana de nitrocelulose foi exposta ao filme radiográfico e a detecção do sinal realizada com luminescência química aumentada. Controle positivo = rim de camundongo. Cada coluna do gel de poliacrilamida foi carregada com 20 µg de proteína total.

4.4.2 – Cortes histológicos marcados pela imunohistoquímica

A análise microscópica da expressão da proteína VEGF durante a progressão da doença periodontal inflamatória em ratos, farmacologicamente tratados ou não com inibidor preferencial da COX-2, revelaram variações morfológicas significativas nos grupos 1 e 2, dependendo do grau do processo inflamatório.

Foi utilizado como controle positivo pulmão de rato, o qual, expressa grande quantidade de VEGF especialmente no epitélio alveolar e brônquico, nas células glandulares do brônquio e em macrófagos alveolares ativado¹²². O padrão de marcação pode ser observado sem nenhuma coloração de fundo, indicando boa qualidade das marcações (Figura 20a-e)

Figura 20 - Detalhe dos cortes histológicos de pulmão de rato imunomarcados contra o antígeno VEGF: a) aspecto geral do controle positivo anticorpo contra VEGF (diluição 1:250); b) detalhe do epitélio brônquico mostrando inúmeras células marcadas (seta); c) detalhe de alguns macrófagos alveolar ativados (seta) imunomarcados; d-e) controle negativo (soro normal de coelho 1:1000).

No lado controle o tecido conjuntivo que constitui a lâmina própria apresentou discreto infiltrado inflamatório por PMNs, no interior do epitélio juncional e sulcular, os quais se encontraram imunomarcados pelo VEGF

(Figura 21). No lado da doença periodontal ocorreu um aumento no processo inflamatório que culminou com o aumento no número de PMNs, os quais expressaram VEGF (Figura 22 e 23).

Durante o processo de acúmulo de biofilme na doença periodontal inflamatória, no período de 3 dias, observou-se aumento expressivo do número PMNs imunomarcados pelo VEGF. Este aumento na expressão do VEGF culmina com a maior reabsorção do osso e do processo alveolar pelos osteoclastos e em menor intensidade das estruturas dentárias radiculares (cimento e dentina). Entre 7 e 14 dias, houve exposição da região cervical da raiz ao meio externo e ao biofilme. O processo inflamatório se mostrou contido acima da crista óssea remanescente apresentando ainda inúmeras PMNs imunomarcados pelo VEGF. No período de 30 dias, o processo de destruição das estruturas remanescentes do periodonto de sustentação praticamente ficou paralisado e algumas áreas exibiram reparo por tecido conjuntivo com alguns fibroblastos expressando VEGF.

No grupo 2, animais tratados com meloxicam, o processo inflamatório foi menos exacerbado e os eventos teciduais demoraram mais tempo para ocorrer quando comparado com o grupo 1 sem tratamento (Figuras 24). Assim, a expressão do VEGF pelos PMNs foi menos intensa nos período de 7 e 14 dias, em relação ao grupo 1. Um fato relevante foi que nos períodos iniciais de 3 e 7 dias, praticamente apenas os PMNs expressaram VEGF, enquanto que, nos períodos de 14 e 30 dias células epiteliais (Figura 25), células dos restos epiteliais de Malassez (Figura 26) e fibroblastos do ligamento periodontal (Figura 27) também passaram a expressar VEGF, acompanhando a reestruturação do periodonto de sustentação.

Figura 21 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado oposto à indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato não tratado com meloxicam, no período de 7 dias. Observar alguns PMNs (setas) imunomarcados para VEGF no interior do tecido epitelial (E) e mais raramente no tecido conjuntivo (TC). Imunoperoxidase

Figura 22 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato não tratado com meloxicam, no período de 7 dia. Observar inúmeras células inflamatórias imunomarcadas para VEGF (setas) dispersas no epitélio e no tecido conjuntivo (TC) adjacente e aglomerados ao redor da ligadura (L) e do biofilme microbiano. Imunoperoxidase

Figura 23 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato não tratado com meloxicam, no período de 14 dias. Observar as células inflamatórias (setas) imunomarcadas para VEGF tanto no epitélio (E) quanto no tecido conjuntivo (TC). Imunoperoxidase

Figura 24 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato tratado com meloxicam, período de 14 dias. Observar áreas de reabsorção (seta vazada) do cimento (C) e da dentina (D) e as células inflamatórias (setas) imunomarcadas para VEGF tanto no epitélio (E) quanto no tecido conjuntivo (TC). Imunoperoxidase

Figura 25 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato não tratado com meloxicam, período de 30 dias. Observar células inflamatórias (setas) e epiteliais (seta vermelha) imunomarcadas para VEGF (setas). Imunoperoxidase

Figura 26 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato tratado com meloxicam, período de 30 dias. Observar a integridade da dentina (D) e do cimento (C), e os fibroblastos do ligamento periodontal e as células epiteliais dos restos epiteliais de Malassez imunomarcadas para VEGF (*). Imunoperoxidase

Figura 27 - Região mesial do primeiro molar inferior do lado com indução da doença periodontal inflamatória experimental em rato tratado com meloxicam, período de 30 dias. Observar a dentina (D) e o cimento (C) íntegros, e os fibroblastos do ligamento periodontal imunomarcados para VEGF (setas). Imunoperoxidase

DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Visando proporcionar uma melhor interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos inicialmente os aspectos referentes à amostra bem como a metodologia aplicada para obtenção dos resultados. Posteriormente, serão realizadas considerações sobre os resultados obtidos mediante análise dos dados e comparando-os com outros trabalhos existentes na literatura.

5.1 – A Amostra

Neste estudo, foram utilizados para a composição da amostra 120 ratos Wistar. Após a erupção dos molares dos ratos, aos 19, 22 e 35 dias de vida animal para primeiro, segundo e terceiro molares respectivamente, a função oclusal só é estabelecida aos 25, 28 e 40 dias para primeiro, segundo e terceiro molares respectivamente⁷². Por isso, neste trabalho, optou-se pela utilização de animais com idade de 60 dias aproximadamente, de acordo com a etapa experimental, quando o ponto de contato já se encontra bem estabelecido. No entanto, com a idade, conforme a atrição interproximal dos molares ocorre uma perda óssea fisiológica resultante dos processos de crescimento e remodelação ósseos¹²⁷. Devido a esta reabsorção fisiológica, o presente estudo foi baseado na comparação com amostras controles, ou seja, sem colocação de ligadura e provenientes do mesmo animal.

Utilizou-se um modelo experimental de indução da doença periodontal inflamatória bem estabelecido em ratos, que envolve a colocação de ligadura ao redor da região cervical do primeiro molar inferior⁷². Neste modelo, a

---

ligadura age como um fator promotor da formação de biofilme na área dentogengival, provocando achatamento e deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal, bem como reduzindo a integridade tecidual pela ulceração ocasional do epitélio sucular, o que permite intensa interação entre hospedeiro e biofilme dentário. A inserção da ligadura com menor trauma possível e sua manutenção subgengival, porém, sem destruir completamente a adesão propiciada pela junção dentogengival, possibilita o acúmulo progressivo e espontâneo de biofilme composto por bactérias presentes na própria microbiota do animal e causado por sua dieta, sem qualquer manipulação adicional. Apesar de não ser uma doença espontânea, a manipulação do animal para sua indução é feita uma única vez e, a partir de então, a doença periodontal inflamatória progride naturalmente¹¹.

Modelos animais têm sido largamente utilizados em benefício da compreensão da patogênese da doença periodontal inflamatória e na avaliação de suas variadas modalidades terapêuticas. Embora não se possam esperar respostas idênticas e agressões semelhantes entre as diferentes espécies, modelos animais podem funcionar como modelos de tendências biológicas e fornecer informações impossíveis de se obter em humanos. Neste sentido, os ratos geralmente são alvo de estudos experimentais da doença periodontal inflamatória, devido às grandes semelhanças com os humanos em relação à arquitetura da região de molares, inclusive da junção dentogengival, baixo custo de pesquisa, fácil manuseio e disponibilidade de utilização de várias raças com diferentes estados microbiológicos e imunológicos^{62,127}. Além disso, estudos longitudinais da doença periodontal inflamatória em humanos levantam vários problemas como a determinação do nível de atividade da doença, riscos

---

individuais e susceptibilidade à progressão da doença. Então, é importante escolher um modelo animal experimental que compartilhe características semelhantes com relação à anatomia e à doença periodontal inflamatória humana¹²⁷. Entre as inúmeras vantagens de se estudar uma doença experimentalmente induzida é poder observar, desde por meio da mais tradicional metodologia até aquelas mais variadas e modernas, seu curso ao longo do tempo, a fim de se compreender sua patogênese e definir a melhor forma de tratá-la⁶².

Assim, a fim de posicionar definitivamente a efetividade dos medicamentos na redução da doença periodontal inflamatórias experimentais são necessárias comprovações clínicas de médio e longo prazo, que possam demonstrar o desempenho dos medicamentos. Embora conscientes de algumas limitações, optamos por este modelo experimental, utilizando ligadura, para estudar o processo inflamatório na doença periodontal e a presença de algumas moléculas específicas, tomando-se o cuidado de evitar traumatizar os tecidos próximos durante a realização da indução.

5.2 – Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido em quatro etapas: Análise Microscópica, RT-PCR, Western Blot e Imunohistoquímica.

Os cortes histológicos para a realização da análise microscópica e imunohistoquímica foram obtidos com 5 µm de espessura, em micrótomo rotatório, de acordo com a rotina do Laboratório de Anatomia e Patologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, como utilizada em outros trabalhos^{7,102}.

A técnica de RT-PCR combina a síntese de cDNA, a partir de moldes de RNA, com PCR para fornecer um método rápido e específico para análise da expressão gênica. RT-PCR é usada para detectar e semi-quantificar a expressão da mensagem, geralmente de pequenas quantidades de RNA¹⁰⁶. No presente estudo, o controle positivo, tanto para COX-2, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, foi realizado com o gene β -actina, utilizado em estudos por SANTOS *et al.* (2002,2003)^{107,108}. No laboratório de Farmacologia da FOB/USP, onde foi realizado a RT-PCR, utiliza-se o gene β -actina rotineiramente, fazendo parte do protocolo de padronização dos resultados dos experimentos desenvolvidos. Estudos do grupo do orientador deste trabalho comprovam que a expressão de β -actina não se altera no decorrer da progressão da doença periodontal¹⁰².

O Western Blot é um método altamente específico para detectar proteínas em um homogenato de células bem trituradas ou extrato de tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar, após desnaturação, proteínas com pesos moleculares diferentes. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, sobre a qual serão usados como sonda anticorpo primário específico contra a proteína de interesse e anticorpo secundário biotinilado associado peroxidase. A detecção do sinal é obtida com adição de um substrato quimioluminescente para esta peroxidase, sendo realizada revelação radiográfica para visualização (bandas). No presente estudo, o controle positivo, para VEGF, foi realizado com rim de camundongo, utilizado em estudos de AMARAL *et al.*(2001a,b,c)²⁻⁴, bem como no laboratório de Fisiologia da Faculdade de Ciências – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, onde foi realizado o Western Blot. Nos

---

---

resultados encontrados neste estudo foi avaliada a quantidade de VEGF na amostra que foi comparada entre grupos e períodos.

O termo imunohistoquímica compreende o processo de identificação de antígenos em secções de tecidos com o auxílio de anticorpos específicos. Essa reação se torna visível por meio de moléculas conjugadas aos anticorpos utilizados. O anticorpo liga-se ao antígeno específico, que por sua vez é reconhecido por um anticorpo secundário ao qual se liga um complexo enzimático streptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase transforma uma substância cromogênica, em geral a diaminobenzidina que confere a reação positiva uma coloração acastanhada²⁰. O anticorpo utilizado nesta pesquisa foi policlonal. Os anticorpos policlonais são gerados a partir de vários clones, ou seja, originam-se de diferentes linfócitos B, o que significa que reagem com vários epítomos do antígeno, ou seja, reconhecem mais de um epítomo em um mesmo antígeno. Já os monoclonais reagem apenas com um determinado epítomo presente em um antígeno²⁰. Neste estudo, utilizamos como controle positivo pulmão de ratos, visto que o pulmão expressa grandes quantidades de VEGF especialmente no epitélio alveolar e brônquico, nas células glandulares do brônquio e em macrófagos alveolares ativados¹²².

5.3 – Precisão da Metodologia

Para a confiabilidade dos resultados desse trabalho, procurou-se minimizar os erros dos métodos de mensuração empregados. Calculou-se a precisão do investigador pelo erro sistemático intra-examinador. O erro sistemático reflete uma falta de padronização do método, uma vez que o examinador tende a sub ou superestimar os valores de suas medições de

---

maneira inconsciente, de modo a direcionar os resultados de acordo com as suas expectativas em relação às conclusões do estudo³¹.

Esses testes foram realizados entre a primeira e segunda medição das mesmas amostras de RT-PCR, num intervalo de trinta dias. Para Western Blot não calculamos o erro sistemático intra-examinador, pois o software Scion Image® utilizado para medir a intensidade das bandas foi o mesmo usado para RT-PCR. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão da metodologia desse estudo foram admissível ($p=0,295$), promovendo resultados transparentes e fidedignos.

5.4 – Resultados

Comparações pertinentes entre os resultados obtidos neste trabalho em relação a outros presentes na literatura devem ser conduzidas com cautela devido à escassez de estudos sobre este assunto. É importante ressaltar que este trabalho é único apesar da existência de alguns semelhantes. Mesmo diante desta dificuldade, torna-se possível estabelecer parâmetros e avaliar o estudo realizado.

Um dos objetivos do presente trabalho foi observar a perda óssea alveolar e o efeito do meloxicam na progressão da doença periodontal inflamatória experimental induzida por ligadura em ratos. Para isso, foram analisados cortes microscópicos dos tecidos duro e mole, previamente mantidos em EDTA, como se fossem material de biópsia. Comparando-se as imagens obtidas em HE, podemos destacar a riqueza de detalhes fornecida pela observação microscópica. Uma visão da relação entre o primeiro e o

---

segundo molares inferiores, revelou o conseqüente acúmulo de agregados e biofilme no fio e na própria superfície dentária, revelando a disposição do infiltrado inflamatório, inclusive nas proximidades do tecido ósseo. As características básicas da acentuada perda óssea alveolar foram bem definidas no modelo experimental utilizado, o que não foi observado nas amostras controle, fortalecendo o papel do biofilme dentário e do fio como um fator local para o acúmulo do referido biofilme na iniciação da doença periodontal inflamatória. Ainda, definimos os períodos iniciais como os mais representativos da indução da doença em ratos, quando já se observam alterações significativas na junção dentogengival e estabelecimento do processo de reabsorção óssea. Nossos resultados estão de acordo com vários outros trabalhos envolvendo a mesma metodologia de indução da doença periodontal inflamatória em ratos, macacos e beagles, que relatam maior exuberância da inflamação e da perda óssea alveolar nas primeiras duas semanas após a colocação da ligadura, com diminuição consistente e gradual até os períodos mais avançados de indução^{1,11,66,93}. Além disso, o elevado metabolismo destes animais acelera a cinética de evolução da doença, o que acaba permitindo um estudo longitudinal em menor tempo, ao se comparar com outras espécies.

Pela análise microscópica descritiva, nos diferentes períodos estudados, observamos que os animais tratados com meloxicam (grupo 2) apresentaram menor perda óssea alveolar quando comparados com os não tratados (grupo 1). Assim, diante dos resultados encontrados, sugere-se que o efeito do meloxicam foi efetivo em diminuir a perda óssea alveolar. Este trabalho apresentou resultados semelhantes aos de BEZERRA *et al.*, 2000¹¹. Estes

autores observaram diferença estatisticamente significativa entre a reabsorção do osso alveolar de ratos tratados e não tratados com meloxicam. Os animais tratados apresentaram diminuição acentuada na reabsorção óssea. Nossos resultados corroboram o estudo de LOHINAI *et al.*, 2001⁷¹, que utilizando o mesmo modelo de indução deste trabalho e tratamento com NS-398, notaram redução na reabsorção óssea, sugerindo que esta droga desempenhou um papel importante na inflamação gengival e na destruição do osso alveolar.

Estes resultados também foram relatados por outros autores suportando os achados deste estudo. GURGEL *et al.*, em 2004⁵⁰, examinaram o efeito da aplicação diária de meloxicam na progressão da doença periodontal inflamatória e observaram significativa diminuição da taxa de perda óssea. HOLZHAUSEN *et al.*, em 2005⁵⁵, avaliaram o efeito da aplicação diária de etoricoxib na progressão da doença periodontal inflamatória e também observaram significativa diminuição da taxa de perda óssea, sugerindo relação positiva entre presença de COX-2, PGE₂ e severidade da doença periodontal. O trabalho de NASSAR *et al.*, 2005⁸², também elucidou o efeito do meloxicam na progressão da perda óssea alveolar durante o desenvolvimento da doença periodontal inflamatória experimentalmente induzida em ratos. Os resultados do presente estudo sugeriram que o tratamento sistêmico com antiinflamatório pode modificar a progressão da doença periodontal inflamatória experimental no período inicial.

Com relação à análise molecular, similarmente ao estudo de AMARAL *et al.* (2001a,c)^{2,4}, as intensidades das bandas foram analisadas por um software, no caso o Scion Image®, específico para esta finalidade. No presente estudo, a expressão de RNAm para VEGF e COX-2 mostrou que os alvos estudados

---

apresentaram correlação positiva ($R=0,80$) durante a progressão do processo inflamatório. Esta correlação foi observada por PAI *et al.*, em 2001⁹⁵, relatando que a inibição da atividade da COX-2 diminuiu significativamente a expressão de VEGF, inibindo por consequência a angiogênese em tumores. Com este propósito, GALLO *et al.*, 2001⁴⁴, também encontraram resultados correlacionando VEGF e COX-2 em tumores.

Na análise estatística de RT-PCR houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,023$) na expressão de RNAm para VEGF na doença periodontal inflamatória entre o grupo 1 e 2, no período de 14 dias. Nos animais tratados com meloxicam (grupo 2) a expressão de RNAm para VEGF diminuiu neste período. Este resultado foi confirmado pelo Western Blot. Nesta análise, observou-se que a expressão da proteína VEGF apresentou diferença estatisticamente significativa entre o lado sadio e o lado afetado pela doença periodontal nos grupos 1 e 2, nos períodos de 3 ($p=0,037$), 7 ($p=0,005$) e 14 ($p=0,008$) dias. No lado da indução da doença periodontal o VEGF mostrou-se mais expresso quando comparado com o controle. Porém, ressalta-se que no período de 14 dias houve uma tendência para menor expressão da proteína VEGF nos animais tratados com meloxicam (grupo 2) quando comparados com os animais não tratados (grupo 1) ($p=0,08$). Isto nos leva a crer que nos outros períodos (3 e 7 dias) alguns fatores podem ter sido compensados por outros mediadores químicos ou células, pois se a PGE_2 (via COX-2) aumenta a expressão de VEGF, esperava-se que nos animais tratados com meloxicam o VEGF estivesse menos expresso em todos os períodos. No período de 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os alvos estudados. Isso foi confirmado pela análise microscópica. Sugere-se que

---

neste período o organismo consiga frear a destruição tecidual, bloqueando o processo inflamatório para a região cervical, sugerindo um quadro de tendência a normalidade. Diante dos resultados encontrados, podemos sugerir que para trabalhos futuros utilizando a metodologia apresentada, a indução experimental até o período de 14 dias é suficiente para avaliação dos fenômenos em resposta ao biofilme aderido à superfície dentária, simulando a doença periodontal inflamatória, particularmente nas suas fases iniciais, em que se evidencia a resposta imune inata.

Não sabemos exatamente o papel do VEGF na doença periodontal inflamatória, mas ao verificar os resultados deste trabalho sugere-se que a correlação entre COX-2 e VEGF possa influenciar alterações na permeabilidade vascular, mostrando-se atuante na doença periodontal inflamatória, uma vez que o tratamento com inibidor preferencial da COX-2 (meloxicam) foi efetivo em diminuir a perda óssea em todos os períodos estudados.

O presente estudo validou relatos prévios da elevada concentração de VEGF na doença periodontal inflamatória. Resultados encontrados na literatura sugerem que na doença periodontal inflamatória ocorrem mudanças no tecido periodontal de suporte e sustentação^{13,23,58}. BOOTH *et al.* (1998)¹³ relataram que nos achados clínicos o VEGF está envolvido na doença periodontal inflamatória. Os resultados mostraram que a concentração de VEGF no fluido gengival é maior que no plasma. JOHNSON *et al.* (1999)⁵⁸ afirmaram que o VEGF pode ser um fator de início na progressão da gengivite e periodontite, possivelmente pela expansão da rede vascular na progressão da inflamação. Sabe-se que nos tecidos inflamados, existem evidências do aumento da

---

expressão de mediadores da inflamação e do aumento no número de vasos, os quais contribuem para progressão da doença periodontal inflamatória²³.

A técnica imunohistoquímica com anticorpos para o VEGF demonstrou, nos grupos 1 e 2, que no lado afetado pela doença periodontal inflamatória houve maior número de imunomarcações positivas em comparação com o lado sadio. Entretanto, quando observamos os animais tratados com meloxicam e os não tratados, menor número de marcações foi nitidamente notado nos animais tratados. Encontramos na literatura alguns trabalhos que utilizaram o VEGF para a marcação das células endoteliais como o trabalho de ZHANG *et al.*, 2001¹³¹, em que os autores demonstraram que a marcação positiva para o VEGF não foi somente encontrada nas células endoteliais, mas também em neutrófilos. No presente trabalho, as células endoteliais e os neutrófilos foram intensamente marcados por este anticorpo. Esta imunomarcação sustenta a afirmação da presença ativa do VEGF na doença periodontal inflamatória. Investigações futuras poderão ajudar elucidar o papel da expressão de VEGF pelas células endoteliais, macrófagos e neutrófilos na doença periodontal inflamatória.

Além disso, há evidências na literatura da interação entre PGE₂, COX-2 e VEGF como relataram MAJIMA *et al.*, em 2000⁷³, em respostas comparativas avaliando tumores. Após a descoberta do VEGF³⁹, muitos estudos preocuparam-se em entender suas funções e mecanismos em eventos fisiológicos e patológicos^{38,42,58,63,88,119}. O VEGF é em grande parte responsável pelo estímulo da proliferação e diferenciação de células endoteliais, e, conseqüentemente, pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de novos vasos sangüíneos, sendo um potente fator angiogênico^{37,77}. Portanto,

---

sua alta expressão durante o período de inflamação contribui para a formação de edema e conseqüente dor. Nos últimos anos foram observadas interações importantes deste fator de crescimento com a progressão de tumores sólidos e revascularização dos tecidos isquêmicos^{18,67}, o que despertou grandes interesses científicos e comerciais, na tentativa de desenvolvimento de novas terapias voltadas para o tratamento e controle do câncer. A angiogênese está intimamente relacionada com o crescimento, progressão e metástase dos tumores. Autores descreveram a interação entre PGE₂, COX-2 e VEGF na progressão de tumores^{35,44,95}. A COX-2 catalisa a formação de PGE₂, a qual aumenta a expressão de VEGF, aumentando a permeabilidade vascular e a angiogênese. Portanto, ao estimular as células endoteliais, o VEGF desempenha papel fundamental na angiogênese. No presente trabalho, o estudo da angiogênese na doença periodontal inflamatória foi iniciado utilizando a imunomarcagem para CD31 (PECAM-1) expresso pelas células endoteliais. Infelizmente, até o momento os resultados não são numerosos os quais nos impedem de sugerir ou especular qualquer análise conclusiva.

De acordo com os conhecimentos, através da literatura, sabe-se que para que ocorra a transdução do sinal, não basta somente à proteína estar disponível na matriz extracelular. A presença de um receptor protéico é essencial para permitir a ligação da molécula sinalizadora. A partir desta ligação uma cascata de eventos (sinalização) é iniciada e o comportamento celular direcionado de acordo com o tipo de célula-alvo⁶¹. Os estudos ainda hoje não relatam um entendimento completo sobre as propriedades individuais de cada receptor na sinalização do VEGF^{35,130}. Os receptores VEGFR-1 e o VEGFR-2 são expressos pelas células endoteliais da parede vascular. A união

---

do VEGF a esses receptores inicia uma cascata de eventos que finalmente estimula o crescimento, sobrevivência e proliferação das células do endotélio vascular⁸⁹. As células endoteliais desempenham funções em variados processos como vasoconstrição e vasodilatação, apresentação de antígenos e são componentes essenciais dos vasos sangüíneos, capilares, veias e artérias. O que se sabe é que o VEGFR-1 desempenha a função de forma a limitar a ligação do VEGF ao VEGFR-2, modulando, assim, a sua atividade, sendo também um receptor capaz de gerar, de alguma forma, um sinal mitogênico^{34,38}. A literatura é unânime sobre as propriedades biológicas do VEGFR-2, caracterizando-o como um receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais^{38,83} quimiotaxia e sobrevivência celular^{38,130}. Por essa razão, o VEGFR-1 e o VEGFR-2 foram alvos deste estudo. Entretanto, a expressão de RNAm para os seus receptores VEGFR-1 e o VEGFR-2 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o lado controle e o lado da doença periodontal, nos animais tratados ou não com meloxicam. Sendo assim, o meloxicam não alterou a expressão dos receptores para VEGF.

Portanto, a análise conjunta dos dados sugere importante participação do VEGF na progressão da doença periodontal e que o inibidor preferencial da COX-2 pode diminuir a perda óssea neste modelo experimental por diminuir a expressão de VEGF. Esta sugestão tem respaldo em resultados recentes da literatura que mostraram a participação do VEGF na perda óssea em outro modelo experimental¹⁰⁰.

Sabe-se que o desequilíbrio na sinalização entre células e moléculas leva a uma resposta inflamatória do organismo, dando início à doença¹⁰¹. Diante dos resultados encontrados no presente trabalho e dos achados da literatura, avalia-se o quão importante é entender o processo inflamatório. Estamos exaustos de estudar e procurar respostas para eventos, nos quais, a doença encontra-se instalada. Isso resolve o problema temporariamente. Precisamos de resultados que permitam intervenção local, bloqueando, assim, o início e desenvolvimento do processo inflamatório. Após o estabelecimento da correlação positiva entre COX-2 e VEGF na doença periodontal inflamatória, vários estudos precisam ser realizados com a necessidade de observações que não se restrinjam somente às conseqüências da doença, mas para o entendimento dos processos moleculares que levam à instalação da patologia. Mesmo com a falta de evidências científicas, este trabalho não nos deixa dúvida de que os resultados encontrados indicam importante relação entre COX-2, VEGF e drogas antiinflamatórias preferenciais para COX-2 na doença periodontal.

5.5 – Uso de antiinflamatórios na odontologia

A grande maioria das afecções odontológicas tem sua etiologia nos processos inflamatórios. Como observamos, o controle da inflamação e de suas conseqüências pode ser abordado por diversos meios, principalmente levando-se em conta a fisiologia do organismo humano^{49,109}.

Os antiinflamatórios são indicados em processos inflamatórios clinicamente relevantes, em que a dor, o edema e a disfunção decorrentes

---

trazem desconforto ao paciente. Não devem ser administrados quando o atendimento odontológico provocar apenas dor, sendo, neste caso, indicado o uso de analgésicos⁹⁰. Assim, conforme o procedimento odontológico realizado pode-se indicar o uso dos antiinflamatórios, o que diminui a intensidade e a duração do processo inflamatório, atenuando assim a dor, o edema e a hipertermia local. Porém, é muito importante estar atento aos seus possíveis efeitos colaterais e reações adversas⁹⁰. No momento de sua prescrição, deve-se levar em conta o estado geral de saúde e as características individuais do paciente, uma vez que mal indicado e, principalmente, mal prescrito, sua agressão pode superar o seu benefício.

Na tentativa de promover maior conforto ao paciente, as ciências da saúde vêm se preocupando constantemente com o desenvolvimento de mecanismos e técnicas capazes de minimizar os sinais clássicos da inflamação, como dor e edema. A utilização de antiinflamatórios tem por objetivo melhorar o resultado clínico e possibilitar a mínima interferência na rotina de vida do paciente, contribuindo para a maior qualidade de vida.

5.6 – Implicações clínicas

Os reflexos da evolução dos conhecimentos genéticos têm sido profundamente sentidos em todas as especialidades odontológicas. De fato, nenhum profissional da saúde, que pretenda exercer suas funções de forma consciente e responsável, pode estar à parte da revolução genética ocorrida nas últimas décadas. A barreira que divide a ciência básica da aplicada, a qual sempre foi tênue, está agora a ponto de desaparecer. Cada vez mais os clínicos necessitarão acompanhar as novas informações científicas.

A partir do momento em que as bases moleculares de desordens geneticamente complexas forem entendidas da mesma maneira que aquelas mais comuns será possível diagnosticar a suscetibilidade da doença antes do seu início em indivíduos de risco e iniciar as estratégias de intervenção. O tema comum por trás de todos esses avanços é que a detecção precoce e diagnóstica da doença pode ser facilitada pela aplicação das técnicas de biologia molecular¹⁰⁴. Os dentistas do futuro próximo deverão ser capazes de prevenir efetivamente as doenças e promover saúde por meio dessas técnicas de diagnóstico. A identificação de alvos moleculares de agentes ambientais nos ajudará a entender o processo da doença e desenvolver estratégias de tratamento apropriadas. Em tais casos, o entendimento da causa da doença exercerá papel chave em testes pré-sintomáticos para identificar e determinar estratégias de tratamento efetivo aos indivíduos de risco¹⁰⁶. Estas informações poderão contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na doença periodontal, os quais serão úteis nas terapias preventivas e curativas da doença periodontal inflamatória, pois sendo destrutiva com a perda de inserção, é responsável pela perda de vários elementos dentários com o avanço da idade, tendo seu início provavelmente na infância a partir da instalação de uma gengivite inflamatória crônica.

Com base nos resultados desta pesquisa, propomos a realização de futuros trabalhos utilizando este modelo de estudo. As modernas técnicas de análise e manipulação genética associadas a métodos de análise bioquímica de ácidos nucleicos e de proteínas estão permitindo que modificações sejam introduzidas nos organismos. Sabemos que a procura por soluções e materiais ideais para qualquer área de conhecimento dentro da Odontologia, atualmente,

---

---

deve estar direcionada ao conhecimento de proteínas expressas pelo nosso próprio organismo às quais, com o auxílio dos princípios de biologia molecular e terapia genética poderão vir a ser investigadas para que, desse modo, os resultados laboratoriais possam ser transportados para a clínica odontológica.

---

*C*ONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho, com a utilização de diferentes técnicas, permite sugerir que:

Existe participação importante do VEGF na doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos e o meloxicam, inibidor preferencial da COX-2, pode modificar a progressão da doença periodontal neste modelo experimental por diminuir a perda óssea e a expressão de VEGF.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alencar, VB; Bezerra, MM; Lima, V; Abreu, AL; Brito, GA; Rocha, FA; Ribeiro, RA. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002; 73 (3):251-6.
  2. Amaral, SL; Linderman, JR; Morse, MM; Greene, AS. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation*. 2001; 8 (1):57-67.
  3. Amaral, SL; Papanek, PE; Greene, AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281 (3):H1163-9.
  4. Amaral, SL; Roman, RJ; Greene, AS. Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl S rats. *Hypertension*. 2001; 37 (2 Part 2):386-90.
  5. Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4 (1):1-6.
  6. Bartold, PM; Narayanan, AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006; 40 29-49.
  7. Batista, AC; Rodini, CO; Lara, VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis*. 2005; 11 (4):249-54.
  8. Becari, C; Sivieri, DO, Jr.; Santos, CF; Moyses, MK; Oliveira, EB; Salgado, MC. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 46 (4):498-504.
  9. Beejay, U; Wolfe, MM. Cyclooxygenase 2 selective inhibitors: panacea or flash in the pan? *Gastroenterology*. 1999; 117 (4):1002-5.
  10. Bezerra, MM; Brito, GA; Ribeiro, RA; Rocha, FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35 (5):613-6.
  11. Bezerra, MM; de Lima, V; Alencar, VB; Vieira, IB; Brito, GA; Ribeiro, RA; Rocha, FA. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2000; 71 (6):1009-14.
  12. Birkedal-Hansen, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993; 28 (6 Pt 2):500-10.
  13. Booth, V; Young, S; Cruchley, A; Taichman, NS; Paleolog, E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1998; 33 (8):491-9.
-

14. Botting, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res.* 2003; 110 (5-6):269-72.
  15. Brown NJ, RLI. Histamine, bradykinin and their antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *Goodman and Gilman's the pharmacologic Basis of therapeutics*. 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill. 2001; 645-67.
  16. Buduneli, N; Vardar, S; Atilla, G; Sorsa, T; Luoto, H; Baylas, H. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels following adjunctive use of meloxicam and initial phase of periodontal therapy. *J Periodontol.* 2002; 73 (1):103-9.
  17. Byrne, AM; Bouchier-Hayes, DJ; Harmey, JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005; 9 (4):777-94.
  18. Carlile, J; Harada, K; Baillie, R; Macluskey, M; Chisholm, DM; Ogden, GR; Schor, SL; Schor, AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30 (8):449-57.
  19. Carmeliet, P; Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407 (6801):249-57.
  20. Carneiro, E. Análise da expressão de MMP-2, -9, -14, TIMP-1, -2 e RECK em granulomas e cistos periapicais. Bauru,. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2005;
  21. Champagne, CM; Buchanan, W; Reddy, MS; Preisser, JS; Beck, JD; Offenbacher, S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2003; 31 167-80.
  22. Chandrasekharan, NV; Dai, H; Roos, KL; Evanson, NK; Tomsik, J; Elton, TS; Simmons, DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (21):13926-31.
  23. Chapple, CC; Kumar, RK; Hunter, N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29 (10):500-6.
  24. Claria, J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des.* 2003; 9 (27):2177-90.
  25. Cohen, MS; Leong, PA; Simpson, DM. Phagocytic cells in periodontal defense. Periodontal status of patients with chronic granulomatous disease of childhood. *J Periodontol.* 1985; 56 (10):611-7.
-

-
26. Crofford, LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 1997; 49 15-9.
  27. Curtis, EK. Inflammatory response. *J Mass Dent Soc.* 2005; 54 (3):48.
  28. de Lima, V; Bezerra, MM; de Menezes Alencar, VB; Vidal, FD; da Rocha, FA; de Castro Brito, GA; de Albuquerque Ribeiro, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108 (2):123-9.
  29. Dubois, RN; Abramson, SB; Crofford, L; Gupta, RA; Simon, LS; Van De Putte, LB; Lipsky, PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J.* 1998; 12 (12):1063-73.
  30. Dumitrescu, AL. Influence of periodontal disease on cardiovascular diseases. *Rom J Intern Med.* 2005; 43 (1-2):9-21.
  31. Estrela, C. *Metodologia Científica.* 2.ed. São Paulo: Artes Médicas Editora. 2005; Cap. 22, p.509-56.
  32. Ferrara, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med.* 1999; 77 (7):527-43.
  33. Ferrara, N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Exs.* 2005; (94):209-31.
  34. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55 15-35; discussion 35-6.
  35. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2 (10):795-803.
  36. Ferrara, N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005; 69 Suppl 3 11-6.
  37. Ferrara, N; Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997; 18 (1):4-25.
  38. Ferrara, N; Gerber, HP; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9 (6):669-76.
  39. Ferrara, N; Henzel, WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161 (2):851-8.
  40. Fleischmann, R; Iqbal, I; Slobodin, G. Meloxicam. *Expert Opin Pharmacother.* 2002; 3 (10):1501-12.
  41. Flemmig, TF. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4 (1):32-8.
-

42. Folkman, J; Shing, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267 (16):10931-4.
  43. Gabay, C; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340 (6):448-54.
  44. Gallo, O; Franchi, A; Magnelli, L; Sardi, I; Vannacci, A; Boddi, V; Chiarugi, V; Masini, E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia.* 2001; 3 (1):53-61.
  45. Gemmell, E; Winning, TA; Grieco, DA; Bird, PS; Seymour, GJ. The influence of genetic variation on the splenic T cell cytokine and specific serum antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol.* 2000; 71 (7):1130-8.
  46. Genco, RJ; Loe, H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1993; 2 98-116.
  47. Ghosh, AK; Hirasawa, N; Niki, H; Ohuchi, K. Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenin-induced granulation tissue in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295 (2):802-9.
  48. Goodson, JM; Dewhirst, FE; Brunetti, A. Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins.* 1974; 6 (1):81-5.
  49. Grassi, RF; Pappalardo, S; De Benedittis, M; Petruzzi, M; Giannetti, L; Cappello, V; Baglio, OA. Drugs in oral surgery. Brief guidelines for adult patients. *Minerva Stomatol.* 2004; 53 (6):337-44.
  50. Gurgel, BC; Duarte, PM; Nociti, FH, Jr.; Sallum, EA; Casati, MZ; Sallum, AW; de Toledo, S. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2004; 75 (12):1613-8.
  51. Hanada, T; Yoshimura, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13 (4-5):413-21.
  52. Hla, T; Bishop-Bailey, D; Liu, CH; Schaeffers, HJ; Trifan, OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31 (5):551-7.
  53. Hoebe, A; Landuyt, B; Highley, MS; Wildiers, H; Van Oosterom, AT; De Bruijn, EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56 (4):549-80.
  54. Holzhausen, M; Rossa Junior, C; Marcantonio Junior, E; Nassar, PO; Spolidorio, DM; Spolidorio, LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002; 73 (9):1030-6.
-

-
55. Holzhausen, M; Spolidorio, DM; Muscara, MN; Hebling, J; Spolidorio, LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2005; 40 (3):208-11.
56. Iniguez, MA; Rodriguez, A; Volpert, OV; Fresno, M; Redondo, JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med.* 2003; 9 (2):73-8.
57. Jin, LJ; Chiu, GK; Corbet, EF. Are periodontal diseases risk factors for certain systemic disorders--what matters to medical practitioners? *Hong Kong Med J.* 2003; 9 (1):31-7.
58. Johnson, RB; Serio, FG; Dai, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol.* 1999; 70 (8):848-52.
59. Kantarci, A; Oyaizu, K; Van Dyke, TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003; 74 (1):66-75.
60. Kantarci, A; Van Dyke, TE. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76 (11 Suppl):2168-74.
61. Karl, E; Warner, K; Zeitlin, B; Kaneko, T; Wurtzel, L; Jin, T; Chang, J; Wang, S; Wang, CY; Strieter, RM; Nunez, G; Polverini, PJ; Nor, JE. Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines. *Cancer Res.* 2005; 65 (12):5063-9.
62. Klausen, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991; 62 (1):59-73.
63. Kohno, S; Kaku, M; Tsutsui, K; Motokawa, M; Ohtani, J; Tenjo, K; Tohma, Y; Tokimasa, C; Fujita, T; Kawata, T; Tanne, K. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. *J Dent Res.* 2003; 82 (3):177-82.
64. Koj, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1317 (2):84-94.
65. Kolenbrander, PE. Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque. *J Appl Bacteriol.* 1993; 74 Suppl 79S-86S.
66. Kuhr, A; Popa-Wagner, A; Schmoll, H; Schwahn, C; Kocher, T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2004; 39 (2):101-6.
-

67. Kumamoto, H; Ohki, K; Ooya, K. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31 (1):28-34.
  68. Leitaó, RF; Rocha, FA; Chaves, HV; Lima, V; Cunha, FQ; Ribeiro, RA; Brito, GA. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2004; 75 (9):1227-32.
  69. Lessard, GM; Torabinejad, M; Swope, D. Arachidonic acid metabolism in canine tooth pulps and the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Endod.* 1986; 12 (4):146-9.
  70. Lipsky, PE; Brooks, P; Crofford, LJ; DuBois, R; Graham, D; Simon, LS; van de Putte, LB; Abramson, SB. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med.* 2000; 160 (7):913-20.
  71. Lohinai, Z; Stachlewitz, R; Szekely, AD; Feher, E; Dezsí, L; Szabo, C. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life Sci.* 2001; 70 (3):279-90.
  72. Madden, TE; Caton, JG. Animal models for periodontal disease. *Methods Enzymol.* 1994; 235 106-19.
  73. Majima, M; Hayashi, I; Muramatsu, M; Katada, J; Yamashina, S; Katori, M. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol.* 2000; 130 (3):641-9.
  74. Mariotti, A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5 (1):27-53.
  75. Masferrer, JL; Leahy, KM; Koki, AT; Zweifel, BS; Settle, SL; Woerner, BM; Edwards, DA; Flickinger, AG; Moore, RJ; Seibert, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000; 60 (5):1306-11.
  76. Mattia, C; Coluzzi, F. COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects. *Minerva Anesthesiol.* 2005; 71 (7-8):461-70.
  77. McCourt, M; Wang, JH; Sookhai, S; Redmond, HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg.* 1999; 134 (12):1325-31; discussion 31-2.
  78. Mitchell, JA; Larkin, S; Williams, TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50 (10):1535-42.
  79. Miyauchi, M; Hiraoka, M; Oka, H; Sato, S; Kudo, Y; Ogawa, I; Noguchi, K; Ishikawa, I; Takata, T. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in
-

- the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Arch Oral Biol.* 2004; 49 (9):739-46.
80. Morton, RS; Dongari-Bagtzoglou, AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *J Periodontol.* 2001; 72 (4):461-9.
81. Nakashima, K; Roehrich, N; Cimasoni, G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol.* 1994; 21 (5):327-33.
82. Nassar, CA; Nassar, PO; Nassar, PM; Spolidorio, LC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. *Pesqui Odontol Bras.* 2005; 19 (1):36-40.
83. Neufeld, G; Cohen, T; Gengrinovitch, S; Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J.* 1999; 13 (1):9-22.
84. Nissen, NN; Polverini, PJ; Koch, AE; Volin, MV; Gamelli, RL; DiPietro, LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 1998; 152 (6):1445-52.
85. Noguchi, K; Ishikawa, I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007; 43 85-101.
86. Noguchi, K; Shitashige, M; Yanai, M; Morita, I; Nishihara, T; Murota, S; Ishikawa, I. Prostaglandin production via induction of cyclooxygenase-2 by human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Inflammation.* 1996; 20 (5):555-68.
87. Noguchi, K; Yanai, M; Shitashige, M; Nishihara, T; Ishikawa, I. Cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin production by peripheral blood monocytes stimulated with lipopolysaccharides isolated from periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol.* 2000; 71 (10):1575-82.
88. Nor, JE; Christensen, J; Mooney, DJ; Polverini, PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999; 154 (2):375-84.
89. Nor, JE; Peters, MC; Christensen, JB; Sutorik, MM; Linn, S; Khan, MK; Addison, CL; Mooney, DJ; Polverini, PJ. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest.* 2001; 81 (4):453-63.
90. Nunn, T; Williams, J. Formulation of medicines for children. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59 (6):674-6.
-

91. O'Banion, MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol.* 1999; 13 (1):45-82.
  92. Offenbacher, S; Heasman, PA; Collins, JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol.* 1993; 64 (5 Suppl):432-44.
  93. Offenbacher, S; Williams, RC; Jeffcoat, MK; Howell, TH; Odle, BM; Smith, MA; Hall, CM; Johnson, HG; Goldhaber, P. Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss. *J Periodontal Res.* 1992; 27 (3):207-13.
  94. Page, RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991; 26 (3 Pt 2):230-42.
  95. Pai, R; Szabo, IL; Soreghan, BA; Atay, S; Kawanaka, H; Tarnawski, AS. PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286 (5):923-8.
  96. Park, JE; Keller, GA; Ferrara, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 1993; 4 (12):1317-26.
  97. Pouliot, M; Clish, CB; Petasis, NA; Van Dyke, TE; Serhan, CN. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry.* 2000; 39 (16):4761-8.
  98. Raisz, LG. The role of prostaglandins in the local regulation of bone metabolism. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 332 195-203.
  99. Rang HP, DM, Ritter JM. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: *Farmacologia.* 5.ed. São Paulo: Elsevier Editora. 2004; Cap. 12, p.164-87.
  100. Ren, W; Zhang, R; Markel, DC; Wu, B; Peng, X; Hawkins, M; Wooley, PH. Blockade of vascular endothelial growth factor activity suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis. *J Rheumatol.* 2007; 34 (1):27-35.
  101. Robbins SL, CR, Kumar VY. Inflamação e Reparo. In: *Patologia Estrutural e Funcional.* 6.ed. São Paulo: Guanabara Koogan Editora. 2000; Cap. 2, p.33-71.
  102. Rodini, CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases-2 e -
-

-
9. Bauru,. 146p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2005;
103. Roy, H; Bhardwaj, S; Babu, M; Kokina, I; Uotila, S; Ahtialansaari, T; Laitinen, T; Hakumaki, J; Laakso, M; Herzig, KH; Yla-Herttuala, S. VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF-kappaB, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Faseb J*. 2006; 20 (12):2159-61.
104. Sakai, VT; Campos, MR; Machado, MA; Lauris, JR; Greene, AS; Santos, CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2007; 17 (3):192-9.
105. Sallay, K; Sanavi, F; Ring, I; Pham, P; Behling, UH; Nowotny, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*. 1982; 17 (3):263-74.
106. Santos, C; Sakai, V; Machado, M; Schippers, D; Greene, AS. Reverse transcription and polymerase chain reactio: principles and applications in dentistry. 2005;
107. Santos, CF; Caprio, MA; Oliveira, EB; Salgado, MC; Schippers, DN; Munzenmaier, DH; Greene, AS. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285 (2):H775-83.
108. Santos, CF; Oliveira, EB; Salgado, MC; Greene, AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39 (5):628-35.
109. Sarkar, C; Das, B; Baral, P. An audit of drug prescribing practices of dentists. *Indian J Dent Res*. 2004; 15 (2):58-61.
110. Schonbeck, U; Sukhova, GK; Graber, P; Coulter, S; Libby, P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1999; 155 (4):1281-91.
111. Shapira, L; Soskolne, WA; Van Dyke, TE. Prostaglandin E2 secretion, cell maturation, and CD14 expression by monocyte-derived macrophages from localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontol*. 1996; 67 (3):224-8.
112. Shimizu, N; Yamaguchi, M; Uesu, K; Goseki, T; Abiko, Y. Stimulation of prostaglandin E2 and interleukin-1beta production from old rat periodontal ligament cells subjected to mechanical stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000; 55 (10):B489-95.
-

113. Simmons, DL; Botting, RM; Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004; 56 (3):387-437.
  114. Slade, GD; Offenbacher, S; Beck, JD; Heiss, G; Pankow, JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res.* 2000; 79 (1):49-57.
  115. Stack, E; DuBois, RN. Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2001; 15 (5):787-800.
  116. Suthin, K; Matsushita, K; Machigashira, M; Tatsuyama, S; Imamura, T; Torii, M; Izumi, Y. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2003; 38 (1):90-6.
  117. Tamura, K; Sakurai, T; Kogo, H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44 (6):411-6.
  118. Tegeder, I; Pfeilschifter, J; Geisslinger, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J.* 2001; 15 (12):2057-72.
  119. Telles, PD; Hanks, CT; Machado, MA; Nor, JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res.* 2003; 82 (6):466-70.
  120. Tonetti, MS; Mombelli, A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4 (1):39-53.
  121. Tsai, CC; Hong, YC; Chen, CC; Wu, YM. Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *J Dent.* 1998; 26 (2):97-103.
  122. Tsokos, M; Pufe, T; Paulsen, F; Anders, S; Mentlein, R. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor in sepsis. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127 (3):331-5.
  123. Tubb, M; Williams, FE; Frazier, LW. Gingival crevicular fluid prostaglandins and gingival phospholipids in experimentally-induced periodontitis in the dog. *Arch Oral Biol.* 1990; 35 (7):529-33.
  124. Van Dyke, TE; Serhan, CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003; 82 (2):82-90.
  125. Vane, JR; Bakhle, YS; Botting, RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38 97-120.
-

-
126. Vane, JR; Botting, RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res*. 1998; 47 Suppl 2 S78-87.
  127. Weinberg, MA; Bral, M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol*. 1999; 26 (6):335-40.
  128. Werner, S; Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83 (3):835-70.
  129. Yucel-Lindberg, T; Nilsson, S; Modeer, T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 1999; 78 (1):61-8.
  130. Zachary, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280 (6):C1375-86.
  131. Zhang, ZH; Wei, SG; Francis, J; Felder, RB. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284 (4):R916-27.
-

Abstract

Abstract

Expression of VEGF on the progression in experimental periodontitis in rats

Inflammatory periodontal disease is characterized by alveolar bone loss and inflammatory changes in the periodontal tissues, which become hemorrhagic and edematous. However, there is little information concerning the biologic mechanisms which may produce these changes. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a macromolecule of importance in inflammation. The aims of this study were to investigate the presence of VEGF during progression of periodontal disease, and to evaluate the effect of a preferential COX-2 inhibitor, meloxicam, on the alveolar bone loss and VEGF expression in experimentally induced periodontitis. One hundred and twenty (120) Wistar rats were randomly separated into two groups [group 1 (no treatment with meloxicam) and group 2 (treatment with meloxicam)]. Silk ligatures were placed at the gingival margin level of the lower right first molar of all rats. Group 2 was treated for 3, 7, 14 and 30 days with meloxicam (3 mg/kg/day, intraperitoneal) and the group 1 was used as control. The expression of VEGF was assessed by RT-PCR, Western Blot and immunohistochemical analysis. Alveolar bone loss was determined by microscopic analysis. The results were submitted to the analysis of Correlation Coefficient by Pearson, Analysis of Variance (ANOVA), and Tukey's post test ($p < 0.05$). A reduction of the alveolar bone resorption was observed in the meloxicam treated group (2), as compared with the control group (1) in all periods studied. There was a positive correlation between COX-2 mRNA and VEGF mRNA in the gingival tissue with periodontal disease ($R = 0.80$). VEGF mRNA expression was significantly lower in rats treated with

---

meloxicam after 14 days ($p=0.023$). No difference in the expression of VEGFR-1 mRNA and VEGFR-2 mRNA was observed for all the periods studied. VEGF protein expression was significantly higher in diseased sites as compared with healthy sites ($p<0.05$). After 14 days lower VEGF protein expression in rats treated with meloxicam was detected ($p=0.08$). Altogether these data suggest an important participation of VEGF in the progression of periodontal disease, and the systemic therapy with meloxicam, preferential COX-2 inhibitor, can modify the progression of experimentally induced periodontitis in rats by reducing the alveolar bone loss and the VEGF expression.

KEY-WORDS: Anti-inflammatory. Cyclooxygenase-2. Periodontal disease. Vascular endothelial growth factor. Inflammation. Meloxicam. Alveolar bone loss.