**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA**

A HIPERTENSÃO PERPETUA A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

JANINE MONTENEGRO TOSCANO MOURA DE MEDEIROS VANDERLEI

PG.PERIO
FORP-USP

**RIBEIRÃO PRETO
2011**

Janine Montenegro Toscano Moura de Medeiros Vanderlei

A Hipertensão Perpetua a Perda Óssea Alveolar

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Júnior

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto
2011

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vanderlei, Janine Montenegro Toscano Moura de Medeiros
A hipertensão perpetua a perda óssea alveolar.
Ribeirão Preto, 2011.
68 p. : il. ; 30 cm

Versão corrigida da dissertação

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Taba Júnior, Mário.

1. Periodontite. 2. Hipertensão. 3. Perda óssea alveolar. 4. SHR.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Janine Montenegro Toscano Moura de Medeiros Vanderlei

A Hipertensão Perpetua a Perda Óssea Alveolar

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em : ____/____/____.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, **Rejane Farias Montenegro**, cuja paixão pela profissão me incentivou a seguir a Odontologia e seus sábios conselhos me levaram a optar pela Periodontia. Exemplo de mãe que, de forma espetacular, dedicou a sua vida aos filhos, realizando-se nas nossas vitórias.*

*Ao meu pai, **Antônio Flávio Toscano Moura**, exemplo de competência e inteligência, que me incentivou a buscar o caminho da sabedoria.*

*Ao meu marido e eterno companheiro, **João Paulo de Medeiros Vanderlei**, que vem construindo comigo todos os nossos sonhos e se faz indispensável em minha vida. Pela dedicação e participação em todas as etapas desta pesquisa e ao final desta jornada, mesmo sofrendo com a nossa distância, sempre me deu forças para seguir adiante, me confortando com todo o seu amor, paciência e compreensão.*

Sem você a concretização deste sonho seria impossível!!

AGRADECIMENTOS

Senhor, eterna é a minha gratidão por teres sempre iluminado os meus caminhos, e abençoado sem limites a minha vida. Sem a Tua luz, indubitavelmente eu não teria chegado até aqui, e sei que seguirei sempre em frente na certeza de que continuarás ao meu lado.

*“Eu posso ir muito além de onde estou
Vou nas asas do Senhor
O Teu amor é o que me conduz
Posso voar e subir sem me cansar
Ir pra frente sem me fatigar
Vou com asas, como águia
Pois confio no Senhor!”
(Eros Biondini)*

Senhor eu sei que realização deste sonho só foi possível porque Tu permitiste e agiste através de palavras e atitudes de diversas pessoas, as quais pouco a pouco que me enriqueceram. E é por isso que eu te louvo e agradeço pela vida de cada uma delas e te peço humildemente, que abençoes profundamente a cada uma das pessoas que citarei a seguir, como forma da minha eterna gratidão:

*Ao orientador **Mário Taba Júnior**, exemplo de pesquisador e orientador, que me acolheu desde a época do estágio na FORP, transmitindo-me tanta sabedoria e depositando em mim tamanha confiança. Pelos conselhos, respeito, amizade, paciência e disponibilidade em todos os momentos. Sem dúvidas, ter sido sua orientada foi uma verdadeira bênção!*

*Ao professor **Arthur Belém Novaes Júnior**, por todo o conhecimento que pôde me transmitir ao longo deste curso, os quais tanto me contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Todos os seus comentários são dignos de louvável respeito e admiração, e foram muito valiosos para mim. E também pelo carinho e confiança demonstrados. Sinto-me muito feliz e privilegiada pela oportunidade de ter sido sua aluna!*

*Ao professor **Márcio Fernando de Moraes Grisi**, pelos ensinamentos, carinho e confiança. Lembrarei sempre do senhor com muito carinho e admiração. Certamente seus ensinamentos estarão sempre presentes em minha memória durante o atendimento aos meus pacientes. Ter sido sua aluna foi uma honra e uma experiência gratificante!*

*À professora **Daniela Bazan Palioto Bule**, pelo carinho, ensinamentos, confiança e amizade demonstrados; por ter sido minha supervisora no PAE durante todo o mestrado, foi muito prazerosa e enriquecedora a nossa convivência durante esse período!*

Ao professor **Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelos conhecimentos transmitidos, pela troca de experiências e pelos agradáveis momentos de convivência. E também à sua adorável esposa, **Adriana Maria Mariano Silveira e Souza**, pelas gentilezas, disponibilidade e presteza na troca de experiências indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao professor **Lino João da Costa**, coordenador do programa de pós-graduação da UFPB, por ter prontamente aceitado o meu convite, dando-me a honra de tê-lo em minha banca.

Aos professores de Periodontia da UFPB **Severino Celestino da Silva e Roberto Lira de Brito**, responsáveis pelos meu primeiro contato com a Periodontia, detentores de louvável respeito e admiração.

Aos professores **Eduardo Gomes Seabra e Michelline Cavalcanti Toscano de Brito**, por terem despertado em mim a paixão pela Periodontia durante a especialização e pelo estímulo a cursar a pós-graduação em Ribeirão Preto.

Aos professores da UFPB que tanto contribuíram na minha formação profissional, em especial a **Marize Raquel Diniz da Rosa e Túlio Pessoa de Araújo**, pela amizade, carinho e confiança desde a minha graduação e pelo incentivo à minha formação acadêmica.

Aos amigos **Michel Messor** que, mesmo à distância, conseguiu de forma exemplar tornar-se imprescindível para a realização deste estudo. E juntamente com **Patrícia Garani**, que esteve sempre ao meu lado, vocês possibilitaram a realização deste trabalho de forma mais prazerosa e menos cansativa.

A **Aninha, Kléber e Luiz Fernando**, alunos do programa de iniciação científica da FORP e UNILAVRAS, que tanto trabalharam nas mais variadas etapas deste estudo, e merecem os mais sinceros votos de sucesso!

A **Raquel Carros** e às professoras **Raquel Gerlach e Cristina Antoniali** pela colaboração neste projeto.

A **Adriana Almeida**, técnica do laboratório de microscopia e processamento de imagens, que me ajudou com a captura de todas as imagens e sempre esteve disponível quando eu precisei.

Às secretárias do departamento de cirurgia e periodontia, **Tati e Dulce**, por todo o apoio e conselhos.

A todos os funcionários da FORP, pelo suporte e contribuição. Dentre eles, os do biotério: **Aline, Serginho e Massaro**, os do departamento e laboratórios: **Roger, Milla, Fabíola, Sebastião, Júnia e Dona Divina**; e da clínica de pós-graduação: **Zilda e Sueli**. Senhor, lembra-Te da disponibilidade de cada uma destas pessoas!

Às amigas **Priscila Paganini e Ingrid** pela receptividade do grupo de pesquisa desde a minha época de estagiária e por terem sido importantes em muitos momentos desde então. À **Priscila Nóbrega**, pela disponibilidade em me ensinar a manipular os animais e por todo o material cedido para a realização deste estudo.

A **Carol Scanavez**, que compôs dupla comigo, pessoa de enorme coração que dividiu grandes momentos comigo neste curso.

A todos os colegas de pós-graduação em Periodontia: **Adriana, Flávia, Priscila Paganini, Luciana Bastos, Luciana Maia, Patrícia Garani, Ingrid, Karina, Danilo, Priscila Nóbrega, Patrícia Freitas, Carol Scanavez, Carol Mandetta, Carol Delmondes, Livia, Lauro, Umberto, Igor, Kelly, Cristine e Felipe**. E aos demais colegas dos outros programas da FORP: **Viviane Mariguela, Renata, Marina, Késsia, Fernanda, Katharina, Priscilla, Mariana, Daniele, Denise**. Cada uma dessas pessoas teve uma participação especial na minha vida em Ribeirão Preto, seja me oferecendo uma amizade verdadeira e sincera ou agradáveis momentos de convivência harmoniosa.

Á **Katharina**, um anjo que entrou na minha casa e na minha vida no momento mais difícil desta jornada, e cumpriu com êxito a promessa que fez a si mesma de não me deixar chorar, tornando-se uma grande companheira-amiga-irmã, e por quase um ano foi a minha família em Ribeirão Preto. Á **Priscilla** que chegou para preencher mais um espaço na nossa casa, trazendo mais alegrias. Vou sentir saudades de cuidar de vocês!

A todos os amigos queridos de João Pessoa, especialmente à **Samara, Verônica**, e à **família Vasconcelos da Rocha**, pelas orações, torcida, apoio a amizade.

E por fim, à minha família, minha fortaleza, que sem a qual eu nada seria.

Aos meus pais, **Antônio Flávio e Rejane**, pela vida, amor incondicional, pelo apoio, pela grande responsabilidade na arte de educar, pelos valores que me passaram, e por serem responsáveis pelo que sou.

À **Tia Côca**, minha segunda mãe, pelo amor incondicional e intercessões, e que juntamente com os meus pais, também é responsável pela minha formação pessoal e espiritual.

A **João Paulo**, um verdadeiro presente divino, simplesmente por me dar a honra e o prazer dividir a vida comigo, estando ao meu lado nas alegrias e tristezas.

Aos meus irmãos **Neto** - que não imagina a falta que me faz desde que sai de casa - **Carol, Flavinho e Pedro Henrique** – que, apesar da distância, sei que estão torcendo por mim - e **Flaviane**, pela sua incansável missão evangelizadora que me trouxe um pouco mais perto de Ti, Deus, e que, através de suas belíssimas canções e voz suave, sempre me acalmou nos momentos de angústia.

A **Dona Anamaria** por nunca ter me recebido como nora, mas sim como filha, abrindo as portas de sua casa e de seu coração, e torcendo pelo meu sucesso.

Às minhas irmãs de coração, **Ceciliana, Fabíola, Chrystina e Goretti**, pela torcida, carinho e apoio e em especial à **Carol** que, em meio a uma enorme e eterna saudade, sinto a sua presença velando por todos nós. Senhor, conserva-a ao Teu lado!

A todos os meus sobrinhos, **Gary, Thamyris, Rurick, Leandro, Lucas, João Miguel, João Pedro, Ana Gabriela, Leonardo, João Victor e Dominique** pelo carinho e alegrias, assim como a **Luiz Eduardo, Anna Beatriz, Ana Clara e Ana Rita**, meus filhos de coração, cujo amor e bilhetinhos minimizavam as saudades. Amo todos vocês!

À **Vozinha**, que sempre intercedeu por todos nós e tem um coração maior que o de todos juntos. Aos meus tios e primos, pelo carinho e apoio e orações.

Abençoa a cada uma dessas pessoas, Senhor, e os conserva na tua divina Paz assim como a quem eu possa ter me esquecido de citar aqui.

Amém!

Agradeço também à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à pesquisa (20100/7007-2), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

*“That you bless me
That you bless me indeed
That you would enlarge all my territories, oh Lord*

*That you bless me
That you bless me indeed
That your hand would be with me
Keeping away from all the evil*

*This is the cry
This is the cry
Of the one that you answered before
Now I am crying
From now on”*

(The prayer of Jabez – I Cro 4,10,
Música: Flaviane Montenegro)

RESUMO

VANDERLEI, J.M.T.M.M. **Hipertensão perpetua a perda óssea alveolar**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto Paulo, 2011.

A medicina periodontal vem mostrando uma associação entre a doença periodontal (DP) e doenças sistêmicas. Entretanto, são poucos os estudos que têm focado no impacto da hipertensão arterial sistêmica na progressão da periodontite. A relação entre estas duas patologias envolve o processo de inflamação, uma vez que a hipertensão está associada à disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi avaliar, morfometricamente, se a hipertensão afeta a progressão da DP através do aumento da perda óssea alveolar mesmo após a remoção da ligadura. Utilizando-se um modelo de periodontite induzida por ligadura, 20 ratos hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats* - SHR) e 20 ratos normotensos (*Wistar Kyoto* - WKY) foram distribuídos nos seguintes grupos: WKY-C, WKY-DP, SHR-C e SHR-DP (C – grupo controle e DP – grupo com doença periodontal). Nos grupos com DP os 1^{os} molares inferiores receberam ligadura com fio de algodão no início do experimento. Após 10 dias, metade dos animais de cada grupo foi sacrificada e a outra metade teve suas ligaduras removidas. No 21^o dia (11 dias após a remoção das ligaduras), os animais restantes foram sacrificados. As mandíbulas tiveram seu tecido mole removido e foram submetidas à análise morfométrica, medindo-se a distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte (COA-JCE, mm) em todos os grupos. Aos 10 dias, os grupos com DP mostraram uma perda óssea maior ($p < 0.05$) que seus controles (SHR-DP = 0.72 ± 0.05 ; SHR-C = 0.39 ± 0.04 ; WKY-DP = 0.75 ± 0.04 e WKY-C = 0.56 ± 0.04). Após a remoção das ligaduras, a perda óssea acumulada foi superior ($p < 0.05$) àquela aos 10 dias com ligadura, apenas no grupo SHR-DP (0.94 ± 0.13 mm). Foram observados 32% de perda óssea adicional após a remoção das ligaduras no grupo SHR-DP e apenas 17% no grupo WKY-DP. Os ratos SHR (83% e 102%) apresentaram um padrão de perda óssea diferente e mais severa que os WKY (32% e 26%) comparando-se com seus respectivos controles, tanto aos 10 quanto principalmente aos 21 dias. Enquanto que a perda óssea nos WKY tendeu a diminuir após a remoção das ligaduras, os SHR apresentaram uma progressão da perda óssea no 21^o dia. Portanto, pode-se especular que a hipertensão está associada com uma perda óssea alveolar mais severa, mesmo após a remoção das ligaduras, e que pode perpetuar a progressão da periodontite.

Palavras-chave: Periodontite, Hipertensão, Perda óssea alveolar, Ratos espontaneamente hipertensos.

ABSTRACT

VANDERLEI, J.M.T.M.M. **Hypertension perpetuates alveolar bone loss**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto Paulo, 2011.

Periodontal medicine has been showing an association between periodontal disease (PD) and systemic diseases. However, few studies have focused on the impact of hypertension on the progression of periodontitis. The correlation of both conditions involves the inflammatory process, once hypertension is associated to endothelial dysfunction. The purpose of this study was to evaluate morphometrically whether hypertension affects PD progression by enhancing bone loss even after ligature removal. Using a ligature-induced periodontitis model, 20 *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) and 20 normotensive rats (*Wistar Kyoto* - WKY) were assigned to one of the following groups: WKY-C, WKY-PD, SHR-C and SHR-PD (C – control group, and PD – periodontitis group). On PD groups, the first mandibular molar received a cotton ligature at baseline. After 10 days, 5 animals of each group were sacrificed and the ligatures of the other animals were removed. On the 21th day (11 days without ligatures), the remaining animals were sacrificed. The jaws were defleshed and the distances between the alveolar bone crests and the cemento-enamel junctions (ABC-CEJ, mm) were measured in all groups. After 10 days, the PD groups showed more bone loss ($p < 0.05$) than the controls (SHR-PD = 0.72 ± 0.05 ; SHR-C = 0.39 ± 0.04 ; WKY-PD = 0.75 ± 0.04 and WKY-C = 0.56 ± 0.04 mm). After ligature removal, the cumulative bone loss was worse ($p < 0.05$) than that one at 10 days with ligature only in SHR-PD group (0.94 ± 0.13 mm). It was observed 32% of additional bone loss in SHR-PD group and only 17% in WKY-PD. The SHR animals (83% and 102%) showed a different and more severe pattern of bone loss than WKY (32% and 26%) related to their respectively controls, at 10 and mainly at 21 days. After ligature removal, bone loss in WKY group tended to diminish, while SHR showed a progressive bone loss in 21st day. Therefore, it may be speculated that the hypertensive condition is associated with an advanced bone loss even after ligature removal that may perpetuate the progression of periodontitis.

Key words: Periodontitis, Hypertension, Alveolar bone Loss, Spontaneously Hypertensive rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento operatório de indução da periodontite por ligadura.

A) Posicionamento do animal na mesa operatória de forma a possibilitar a abertura bucal e o acesso aos dentes posteriores para a instalação das ligaduras. B) Com o auxílio de sonda exploratória para afastar levemente o espaço entre o 1° e o 2° molar e permitir a passagem do fio de algodão. C) Com o auxílio de porta-agulhas o fio foi introduzido na região interproximal. D) Ligadura posicionada ao redor do 1° molar inferior, com o nó na face méso-lingual. A presença do fio multifilamentar na região cervical dos dentes facilita o depósito de biofilme, iniciando um processo inflamatório e induzindo a periodontite.30

Figura 2: Desenho experimental. A periodontite foi induzida nos animais dos grupos com DP no início do experimento. Após 10 dias, metade dos animais de todos os grupos foi sacrificada e as ligaduras da outra metade dos animais dos grupos com DP foi removida, com a finalidade de se avaliar as alterações ósseas após a fase de indução da periodontite. Aos 21 dias, os animais remanescentes de todos os grupos foram sacrificados.30

Figura 3: Fotografias das mandíbulas após a remoção do tecido mole e coloração com azul de metileno. Medidas ilustrativas da perda óssea no grupo controle (A) e no grupo DP (B). A perda óssea no grupo DP (B) consiste em migração apical da crista óssea e exposição das áreas interdentais e região de furca. A distância entre a crista óssea alveolar (COA) e a junção ceto-esmalte (JCE) foi medida em três pontos da área interpromixal entre o 1° e o 2° molar (linhas amarelas).31

Figura 4: Níveis de perda óssea nos grupos SHR e WKY. As barras indicam a média $\pm$ EPM das distâncias COA-JCE (mm) na área interproximal entre o 1° e o 2° molar, no 10° e 21° dia do experimento. As medidas aos 21 dias correspondem ao efeito de 10 dias de indução da periodontite com ligadura, acrescido de 11 dias após a remoção das ligaduras. A análise intra-grupo mostra uma maior perda óssea nos grupos com DP em comparação aos seus controles

(C). A análise da progressão da periodontite, entre os tempos 10 e 21, mostra uma progressão da perda óssea somente no grupo SHR-DP ($p < 0.05$). $*p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significante. COA-JCE = crista óssea alveolar - junção cimento-esmalte; SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = wistar-kyoto, controle de normotensos.35

Figura 5: Progressão da perda óssea após a remoção das ligaduras (%). O percentual de perda óssea adicional após a remoção das ligaduras foi calculado a partir da diferença das médias das distâncias COA-JCE (mm) ente 10 e 21 dias. O percentual de perda óssea adicional no grupo WKY-DP (17%) foi similar aquele apresentado pelos seus controles (WKY-C = 23%), enquanto que o grupo SHR-DP (32%) apresentou uma perda óssea adicional superior a seus controles (SHR-C = 19%). COA-JCE = crista óssea alveolar - junção cimento-esmalte; SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = ratos Wistar-Kyoto, controle de normotensos.36

Figura 6: Gráfico da severidade da perda óssea alveolar. Diferença percentual de perda óssea nos grupos com DP comparada a seus controles, aos 10 e 21 dias. O grupo SHR apresentou uma percentual de perda óssea mais severa que o grupo WKY em ambos os períodos de tempo, em relação a seus respectivos controles. Além disso, os animais SHR nostraram um padrão de perda óssea progressiva após a remoção das ligaduras, em contraste ao padrão de perda óssea apresentado pelos WKY, que tendeu a diminuir no 21º dia do experimento. SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = ratos Wistar-Kyoto, controle de normotensos; DP= periodontite.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores COA-JCE (mm). Médias $\pm$ EPM das distâncias COA-JCE (mm) obtidas aos 10 e 21 dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$), intra e entre-grupos, através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Duncan.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SHR	Spontaneously Hypertensive Rat
WKY	Rato Wistar-Kyoto
DP	Periodontite
C	Grupo Controle
SHR-DP	Grupo de ratos hipertensos com periodontite
SHR-C	Grupo de ratos hipertensos sem periodontite
WKY-DP	Grupo de ratos normotensos com periodontite
WKY-C	Grupo de ratos normotensos sem periodontite
JCE	Junção cimento-esmalte
COA	Crista óssea alveolar
COA-JCE	Distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar
IL-6	Interleucina 6
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
PCR	Proteína C reativa
PTH	Paratormônio
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
NO	Óxido nítrico
PAS	Pressão arterial sistólica
mmHg	Milímetros de mercúrio
mm	Milímetro
mL	Mililitro
g	Gramas
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligramas por mililitro
Two-way ANOVA	Análise de variância a dois critérios

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	21
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	28
Animais	28
Registro do peso corpóreo e pressão arterial	28
Indução da periodontite experimental por ligadura e desenho experimental	29
Análise do nível ósseo alveolar	31
Análise estatística	32
RESULTADOS.....	34
Avaliação do nível ósseo alveolar	34
DISCUSSÃO	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE – Artigo	52
ANEXO – Protocolo do Comitê de Ética.....	68

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A periodontite consiste em uma doença inflamatória crônica iniciada pela ação bacteriana, que pode ocasionar destruição dos tecidos de suporte dental. Considerada atualmente uma das principais causas de perda dentária em adultos, é uma doença bastante prevalente na população, tendo sua forma crônica conhecida como periodontite crônica, atingindo de 35% a 60% da população adulta, enquanto sua forma mais agressiva (periodontite agressiva) apresenta um padrão de destruição mais rápido e acomete aproximadamente 10% a 15% da população¹.

Embora o fator etiológico primário da periodontite seja o biofilme dental, a resposta do hospedeiro e várias condições sistêmicas tais como diabetes, artrite reumatoide, hipertireoidismo, doenças cardiovasculares e hipertensão parecem estar associadas com o seu desenvolvimento^{2,3}.

A hipertensão arterial é uma desordem muito prevalente na população mundial e um fator de risco importante para o desenvolvimento da aterosclerose e doenças cardiovasculares. A inflamação pode estar envolvida na patogenia da hipertensão pela ação de mediadores pró-inflamatórios, associados à disfunção endotelial e ao aumento da rigidez arterial, visto que já foi demonstrada uma associação entre marcadores inflamatórios, tais como proteína C reativa (PCR), IL-6, e TNF- α com doenças cardiovasculares, aterosclerose e hipertensão^{4,5}.

Tendo em vista que a hipertensão altera a expressão de tais mediadores inflamatórios a nível sistêmico, que a periodontite também envolve uma etiologia de cunho inflamatório com envolvimento dos mesmos biomarcadores (IL-6, PCR e TNF- α)⁶⁻⁹ e que a terapia periodontal diminui os níveis sanguíneos desses marcadores em pacientes hipertensos¹⁰, é possível inferir que ambas as patologias possam estar associadas por meio do processo inflamatório.

Já foi observada uma associação entre a severidade da periodontite e a hipertensão em um estudo clínico envolvendo 4.254 pacientes¹¹. Angeli et al., em 2003¹² também demonstraram que o aumento da massa ventricular esquerda, complicação cardiovascular presente em aproximadamente um terço dos pacientes hipertensos, relaciona-se diretamente com a severidade da DP.

Além disso, alguns estudos têm sugerido que a hipertensão possa causar alterações metabólicas no tecido ósseo devido à elevação dos níveis séricos do paratormônio (PTH), do cálcio ionizado e diminuição do conteúdo de cálcio ósseo¹³⁻¹⁵. Assim, a hipertensão vem sendo associada a uma menor densidade mineral óssea tanto em humanos^{13,15} quanto em ratos hipertensos¹⁶⁻¹⁸.

Apesar das evidências, são poucos os estudos que têm avaliado os efeitos da hipertensão arterial nos tecidos de suporte periodontal, os quais são de grande importância para a manutenção dos dentes e implantes. Além disso, os estudos experimentais que verificaram os efeitos da hipertensão na periodontite,^{19,20} somente avaliaram os seus efeitos sob a indução da DP por ligadura, sem, contudo avaliar os efeitos da hipertensão na progressão da DP após a remoção das ligaduras.

Até o momento não sabemos como se comporta o metabolismo ósseo alveolar após a remoção da ligadura em ratos hipertensos comparados a ratos normotensos. A reabsorção óssea pode progredir ou ocorrer regeneração tecidual e a velocidade em que esses fenômenos ocorrem pode ser maior ou menor quando comparados a ratos normotensos.

Tendo em vista a alta prevalência da hipertensão e da periodontite, pesquisas que enfoquem a associação entre as duas patologias podem ter grande impacto nas políticas de saúde pública, oferecendo subsídios que apoiem o diagnóstico e tratamento diferenciado e, por conseguinte, uma melhor qualidade de vida à população.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório causado pelo desequilíbrio entre a microbiota periodontal e a resposta do hospedeiro⁷, em que a expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias ocasiona a destruição tecidual^{21,22}. O processo inflamatório nos tecidos periodontais inicia-se com uma destruição tecidual da gengiva e, se este não for adequadamente tratado, pode progredir para periodontite, afetando o ligamento periodontal e o osso alveolar, ocasionando danos irreversíveis aos tecidos de suporte dental, podendo resultar na perda dentária¹.

Embora o fator etiológico primário da doença periodontal seja o biofilme dental, a resposta do hospedeiro e várias doenças sistêmicas parecem estar associados com o seu desenvolvimento^{2,3}.

A medicina periodontal vem demonstrando que alterações sistêmicas tais como diabetes, hipertireoidismo, dislipidemia e doenças cardiovasculares podem influenciar a inflamação periodontal. Alguns estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado uma associação entre a severidade da periodontite e a hipertensão^{11,12,20,23} e também tem associado a hipertensão com a sobrevivência dental^{11,12,24,25}.

A hipertensão arterial é uma condição multifatorial de grande prevalência na população mundial^{17,24,25}, caracterizada pela disfunção endotelial devido ao desequilíbrio na expressão do óxido nítrico (NO) na parede vascular^{26,27}.

O óxido nítrico produzido na célula endotelial é responsável pelo balanço regulatório do tônus vascular devido a sua ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e também exerce um efeito protetor vascular antiaterogênico através de inibição da atividade plaquetária, agregação de leucócitos, oxidação do colesterol LDL e proliferação das células musculares lisas da parede vascular^{26,27}. Assim o NO endotelial é essencial na modulação da pressão arterial, e sua expressão diminuída, como ocorre na disfunção endotelial, favorece ao aumento da pressão intravascular e ao aparecimento de micro lesões vasculares.

Tais micro lesões vasculares podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e manutenção do processo aterosclerótico através de mecanismos inflamatórios que resultam na redução do lúmen vascular e aumento da rigidez arterial, ocasionando a elevação da resistência vascular periférica, característica da maioria dos casos de hipertensão essencial^{17,28}. A cronificação desse quadro também pode levar ao comprometimento de importantes órgãos, como os rins e o coração. Desta forma, a hipertensão pode ser considerada uma síndrome na qual a doença microvascular e o envolvimento renal são componentes-chave²⁸.

A correlação entre hipertensão e periodontite pode envolver o processo inflamatório sistêmico presente na periodontite e na disfunção endotelial, um dos primeiros fatores no desenvolvimento da hipertensão e aterosclerose.

Já foi demonstrado que a disfunção endotelial, além de alterar o balanço regulatório do tônus vascular através da diminuição do NO, também está associada ao aumento dos níveis sanguíneos de IL-6, TNF- α e proteína C reativa (PCR)^{24,25}. Além disso, a periodontite de moderada a severa pode afetar marcadores sistêmicos imune e inflamatórios quais sejam PCR, IL-6 e TNF- α ⁹, e a terapia periodontal pode diminuir os níveis sanguíneos desses marcadores em pacientes hipertensos¹⁰.

Adicionalmente a hipertensão crônica pode comprometer a atividade renal, induzindo a um estado hipocalcêmico, com a ativação secundária das glândulas paratireóides. Dessa forma, ocorre um aumento compensatório do PTH, principal hormônio envolvido no controle do cálcio, o qual estimula uma atividade osteoclástica e inibe a osteoblástica, mobilizando o cálcio presente no tecido ósseo^{13-15,17,19}.

Estas alterações que correm na presença de uma condição hipertensiva resultam na diminuição da densidade mineral óssea e podem prejudicar o reparo ósseo, tanto em humanos quanto em ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*)^{16,17}.

A linhagem de ratos SHR foi criada através de sucessivos cruzamentos de um casal de ratos selecionados numa colônia de ratos da raça Wistar que apresentaram pressão arterial elevada na Universidade de Kyoto, Japão, por Okamoto e Aoki em 1966. Após estes sucessivos cruzamentos, nasceram animais que apresentaram de forma uniforme, uma PAS (pressão arterial sistólica) superior a 180 mmHg²⁹. Em 1970, uma segunda cepa de ratos foi selecionada da mesma colônia que originou os

SHR, porém escolhendo-se o casal normotenso, esta segunda cepa foi designada como Wista-Kyoto (WKY)²⁹.

Os SHRs vêm sendo largamente utilizados na literatura como um adequado modelo experimental para a hipertensão, por apresentarem as mesmas manifestações sistêmicas às apresentadas nos humanos, quais sejam: alterações hemodinâmicas, endócrinas e orgânicas^{17,30}. Já os ratos WKY, por apresentarem características genéticas semelhantes aos SHR, excetuando-se a hipertensão, vêm sendo utilizados na maioria dos estudos e considerados como o melhor controle normotenso para os SHR^{29,31}.

Apesar das evidências apresentadas, poucos estudos têm focado no impacto da hipertensão sob os tecidos periodontais e avaliado seus efeitos no osso alveolar na presença de infecção bacteriana^{19,20}. Além disso, já foi demonstrado que ratos SHR apresentam severas alterações na qualidade óssea^{19,20}, porém esses estudos focaram apenas nas alterações de perda óssea sob a indução da periodontite sem, contudo, avaliar as alterações ósseas após a remoção das ligaduras. E partindo-se do princípio que a ligadura exerce o seu papel de iniciador da periodontite por facilitar o acúmulo de biofilme e também agir como um fator irritante local, acreditamos que somente após a remoção das ligaduras, o papel da resposta do hospedeiro na progressão da periodontite poderia ser avaliado.

Tendo em vista a prevalência da hipertensão e a importância da preservação dos tecidos de suporte periodontal para a manutenção de dentes e implantes e promoção da saúde bucal, o objetivo deste estudo foi avaliar i) se a hipertensão afeta a perda óssea alveolar induzida por ligaduras e ii) a importância do papel do hospedeiro na progressão da doença periodontal após a remoção das ligaduras, sob uma condição hipertensiva.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 20 ratos machos hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats* - SHR) e 20 ratos machos normotensos (*Wistar Kyoto* - WKY) com aproximadamente 10 a 12 semanas neste estudo, os quais foram igualmente distribuídos nos seguintes grupos: WKY-C, WKY-DP, SHR-C e SHR-DP (C – grupo controle, e DP – grupo com periodontite), que foram sacrificados em dois tempos, aos 10 e 21 dias, constituído assim 8 subgrupos, de acordo com os tempos de sacrifícios.

Os animais foram mantidos em grupos de 5 ratos por caixa, em sala com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada de (22-24°C) no biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e tiveram livre acesso à dieta laboratorial padrão e água filtrada.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (protocolo nº 10.1.379.53.2).

Registro do peso corpóreo e pressão arterial

O peso corpóreo e a pressão arterial dos animais foram registrados no início do experimento e depois semanalmente, até o momento do sacrifício. A pressão arterial sistólica (PAS) foi verificada através do método indireto de pletismografia de cauda, utilizando-se um pletismógrafo manual adaptado para ratos. Os registros foram realizados por um único operador, no período da manhã, em sala com controle de luminosidade e ruídos para evitar o estresse dos animais. Foram considerados hipertensos apenas os animais que apresentaram PAS superior a 150 mmHg (valor mínimo de PAS para o rato ser considerado hipertenso).

Indução da periodontite experimental por ligadura e desenho experimental

O protocolo de indução da periodontite por ligadura vem sendo largamente utilizado em estudos experimentais. A presença da ligadura na região cervical dos dentes facilita um processo inflamatório induzido pelo acúmulo de biofilme, caracterizando uma periodontite aguda e levando à reabsorção óssea alveolar³².

Para posicionar a ligadura nos grupos com DP, os animais foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal com solução de Cloridrato de Xilazina a 2%* (8mg/kg) e Cloridrato de Ketamina a 10%† (75 mg/Kg).

Após a anestesia, os animais foram posicionados em mesa operatória, a qual permite a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula (Figura 1).

Com o auxílio de sonda exploradora odontopediátrica‡ e porta agulha tipo castroviejo§ foi colocada uma ligadura de fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores de cada animal dos grupos com DP (Figura 1). Este procedimento foi realizado no início do experimento. A presença das ligaduras foi verificada periodicamente, e em caso de perda desta, um novo animal fora preparado para o estudo.

No 10º dia do experimento, 5 animais de cada grupo (WKY-C, WKY-PD, SHR-C e SHR-PD) foram sacrificados para a análise da perda óssea, e a outra metade dos animais tiveram apenas as suas ligaduras removidas.

No 21º dias do experimento, ou seja, 11 dias após a remoção das ligaduras, os animais restantes foram submetidos ao sacrifício, a fim de se avaliar o papel da resposta do hospedeiro na progressão da DP após a remoção das ligaduras. O desenho experimental deste estudo está ilustrado na figura 2 e foi previamente descrito por Graves et al (2006)³³ e Coimbra et al (2011)³⁴.

Todos os animais foram sacrificados por meio de overdose anestésica com solução de Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de Ketamina 10% nas respectivas doses de 30mg/Kg (Xilazina) e 240mg/Kg (Ketamina) e tiveram suas mandíbulas removidas para a avaliação da perda óssea alveolar por meio da análise morfométrica do tecido ósseo.

*Dopaser, Herpate Calier, Juatuba – MG, Brazil.

†Agener, São Paulo – SP, Brazil.

‡Hu-friedy, Chicago, USA

§ Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil

Figura 1: Procedimento operatório de indução da periodontite por ligadura. A) Posicionamento do animal na mesa operatória de forma a possibilitar a abertura bucal e o acesso aos dentes posteriores para a instalação das ligaduras. B) Com o auxílio de sonda exploratória para afastar levemente o espaço entre o 1° e o 2° molar e permitir a passagem do fio de algodão. C) Com o auxílio de porta-agulhas o fio foi introduzido na região interproximal. D) Ligadura posicionada ao redor do 1° molar inferior, com o nó na face méso-lingual. A presença do fio multifilamentar na região cervical dos dentes facilita o depósito de biofilme, iniciando um processo inflamatório e induzindo, por conseguinte, a periodontite.

Figura 2: Desenho experimental. A periodontite foi induzida nos animais dos grupos com DP no início do experimento. Após 10 dias, apenas metade dos animais de todos os grupos foi sacrificada e as ligaduras da outra metade dos animais dos grupos com DP foi removida, com a finalidade de se avaliar as alterações ósseas após a fase de indução da periodontite. Aos 21 dias, os animais remanescentes de todos os grupos foram sacrificados.

Análise do nível ósseo alveolar

Após os sacrifícios, as hemimandíbulas de todos os animais tiveram seu tecido mole química e biologicamente removido. Posteriormente as hemimandíbulas foram coradas com solução aquosa de azul de metileno a 1% a fim de diferenciar o tecido ósseo do dental e facilitar a visualização da junção ceto-esmalte (JCE).

Utilizando um estereomicroscópio^{**} acoplado a uma câmera fotográfica digital, as superfícies linguais das hemimandíbulas foram fotografadas de forma padronizada em um aumento de 20x. Para a captura das imagens as hemimandíbulas foram posicionadas de tal forma que as cúspides vestibulares e linguais ficassem sobrepostas e que as superfícies oclusais não fossem visualizadas.

Para a avaliação do nível ósseo, a distância da junção ceto-esmalte à crista do osso alveolar (COA-JCE, mm) foi medida na superfície distal da raiz distal do primeiro molar, na superfície mesial da raiz mesial do segundo molar e no centro da região interproximal entre o 1° e o 2° molar (Figura 3) utilizando um programa de análise de imagens^{††}. A fim de reduzir as variações, a média das três distâncias medidas foi utilizada para a análise. Todos os registros do nível ósseo foram realizados duas vezes, cegamente, em dias distintos, por um examinador calibrado.

Figura 3: Fotografias das mandíbulas após a remoção do tecido mole e coloração com azul de metileno. Medidas ilustrativas da perda óssea no grupo controle (A) e no grupo DP (B). A perda óssea no grupo DP (B) consiste em migração apical da crista óssea e exposição das áreas interdentais e região de furca. A distância entre a crista óssea alveolar (COA) e a junção ceto-esmalte (JCE) foi medida em três pontos da área interproximal entre o 1° e o 2° molar (linhas amarelas).

^{**} Leica MZ6, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany.

^{††} Image J - National Institutes of Health, Washington, DC, USA.

Análise estatística

Todos os dados foram organizados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), considerando o animal como unidade experimental. Para a análise estatística, foram utilizadas as médias das três medidas COA-JCE (mm) em cada espécime. As diferenças entre os grupos foram verificadas através da análise de variância a dois critérios (*Two-way ANOVA*) seguida do teste Duncan para comparações múltiplas. Níveis significantes foram estabelecidos em 95% ($p < 0.05$) e todos os cálculos foram executados utilizando-se o programa Statistica 5.1 do Windows^{‡‡}.

^{‡‡} StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os efeitos da hipertensão na periodontite foram avaliados através da mensuração da perda óssea alveolar utilizando-se um modelo de periodontite induzida por ligadura bem como avaliando seus efeitos verificando-se os níveis de perda óssea alveolar após a remoção destas ligaduras em ratos hipertensos.

Durante o experimento, não foram observadas mudanças significantes no peso corpóreo nos grupos do estudo. Foi observada uma maior média de peso corpóreo no grupo WKY (334.5 ± 8.1 g) em comparação àquela apresentada pelos animais SHR (247.1 ± 5.3 g).

Como esperado, todos os animais SHR apresentaram PAS elevada. A média $\pm$ EPM dos níveis de PAS para os ratos SHR foi 192.7 ± 1.1 mmHg e para os WKY foi 120.7 ± 1.6 mmHg. Não foram observadas variações significantes de PAS entre os grupos do estudo durante este experimento que pudessem ser relacionadas à indução da periodontite.

Avaliação do nível ósseo alveolar

Para avaliar o impacto da hipertensão nas alterações ósseas presentes na progressão da periodontite, a distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte (COA-JCE, mm) foi mensurada em três pontos da área interproximal entre o 1° e o 2° molar em ratos hipertensos (SHR) (Figura 3). A fim de se estabelecer um critério comparativo, foram utilizados os ratos *Wistar-Kyoto* (WKY) como controle normotenso, conforme descrito na metodologia deste trabalho.

A análise intra-grupo revelou que após 10 dias da indução da periodontite por ligadura os grupos com DP mostraram um aumento da perda óssea ($p < 0.05$) em relação a seus controles, através da mensuração dos valores COA-JCE (mm). As médias $\pm$ EPM da distância COA-JCE apresentados por cada grupo foram: SHR-DP = 0.72 ± 0.05 ; SHR-C = 0.39 ± 0.04 ; WKY-DP = 0.75 ± 0.04 e WKY-C = 0.56 ± 0.04 mm (Tabela 1 e Figura 4). Não foram observadas diferenças ($p > 0.05$) entre os grupos SHR-DP e WKY-DP (Figura 4).

Aos 21 dias do experimento, os grupos com DP apresentaram maior perda óssea acumulada que os controles ($p < 0.05$), porém não foram observadas diferenças de perda óssea acumulada entre os grupos SHR-DP e WKY-DP ($p > 0.05$) (Figura 4). As médias $\pm$ EPM das distâncias COA-JCE de cada grupo foram: SHR-DP = 0.95 ± 0.13 ; SHR-C = 0.47 ± 0.04 ; WKY-DP = 0.88 ± 0.04 e WKY-C = 0.70 ± 0.05 mm (Tabela 1). Após a remoção das ligaduras, foi observada uma perda óssea adicional, entre o 10° e o 21° dia, significativamente maior somente no grupo SHR-DP ($p < 0.05$) (Figura 4).

Tabela 1: Valores COA-JCE (mm). Médias $\pm$ EPM das distâncias COA-JCE (mm) obtidas aos 10 e 21 dias do experimento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$), intra e entre grupos, através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Duncan.

Grupo	10 dias	21 dias
SHR-C	$0.39 \pm 0.04^{a, e}$	$0.47 \pm 0.04^{b, f}$
SHR-DP	$0.72 \pm 0.05^{a, ab}$	$0.95 \pm 0.13^{b, ab}$
WKY-C	$0.57 \pm 0.04^{c, e}$	$0.70 \pm 0.05^{d, f}$
WKY-DP	0.75 ± 0.04^c	0.88 ± 0.04^d

Figura 4: Níveis de perda óssea nos grupos SHR e WKY. As barras indicam a média $\pm$ EPM das distâncias COA-JCE (mm) na área interproximal entre o 1° e o 2° molar, no 10° e 21° dia do experimento. As medidas aos 21 dias correspondem ao efeito de 10 dias de indução da periodontite com ligadura, acrescido de 11 dias após a remoção das ligaduras. A análise intra-grupo mostra uma maior perda óssea nos grupos com DP em comparação aos seus controles (C). A análise da progressão da periodontite, entre os tempos 10 e 21, mostra uma progressão da perda óssea somente no grupo SHR-DP ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. COA-JCE = crista óssea alveolar - junção cimento-esmalte; SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = wistar-kyoto, controle de normotensos.

Para avaliar a progressão da DP após a remoção da ligadura, foi observada a perda óssea adicional de cada grupo, calculando-se a diferença das médias das distâncias COA-JCE (mm) obtidas entre os tempos 10 e 21 dias. Os valores calculados em cada grupo foram: SHR-DP = 0.23; SHR-C = 0.08; WKY-DP = 0.13 e WKY-C = 0.13, mm. Convertendo-se tais valores em percentual de perda óssea, foi possível observar uma perda óssea adicional equivalente a 32% no grupo SHR-DP comparada com apenas 17% no grupo WKY-DP em relação aos níveis de perda óssea apresentados aos 10 dias (Figura 5).

A figura 5 mostra que os animais em que a DP não foram induzida apresentaram um percentual de perda óssea adicional, entre o 10º e 21º dia do experimento, variando entre 19% (SHR-C) e 23% (WKY-C). Enquanto que o percentual de perda óssea adicional apresentada pelo grupo WKY-DP (17%) foi próximo ao apresentado pelo seu respectivo controle (23%), o grupo SHR-DP apresentou um percentual de perda óssea adicional (32%) superior ao apresentado pelo seu controle (19%).

Figura 5: Progressão da perda óssea após a remoção das ligaduras (%). O percentual de perda óssea adicional após a remoção das ligaduras foi calculado a partir da diferença das médias das distâncias COA-JCE (mm) entre 10 e 21 dias. O percentual de perda óssea adicional no grupo WKY-DP (17%) foi similar aquele apresentado pelos seus controles (WKY-C = 23%), enquanto que o grupo SHR-DP (32%) apresentou uma perda óssea adicional superior a seus controles (SHR-C = 19%). COA-JCE = crista óssea alveolar - junção cimento-esmalte; SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = ratos Wistar-Kyoto, controle de normotensos.

A severidade da perda óssea nos grupos SHR e WKY foi calculada através da diferença das médias das distâncias COA-JCE (mm) entre os animais com DP e aqueles que não foram submetidos à indução da DP, tanto aos 10 quanto aos 21 dias do experimento. Os respectivos valores calculados para SHR e WKY foram 0.32 e 0.18 mm aos 10 dias e 0.48 e 0.18 mm aos 21 dias. Os valores percentuais

correspondentes a esta medida estão dispostos na figura 6, a qual mostra uma maior severidade da perda óssea no grupo SHR quando comparado ao grupo WKY, principalmente aos 21 dias. Após a remoção das ligaduras, os animais SHR apresentaram aproximadamente o dobro da perda óssea que os níveis COA-JCE apresentados pelos seus respectivos controles.

Além disso, a figura 6 revela um padrão de perda óssea alveolar com tendência a diminuir nos animais WKY, entre o 10º e o 21º dia do experimento, enquanto que os animais SHR apresentaram um padrão de perda óssea progressivo, mesmo após a remoção das ligaduras.

Figura 6: Gráfico da severidade da perda óssea alveolar. Diferença percentual de perda óssea nos grupos com DP comparada a seus controles, aos 10 e 21 dias. O grupo SHR apresentou uma percentual de perda óssea mais severa que o grupo WKY em ambos os períodos de tempo, em relação a seus respectivos controles. Os animais SHR mostraram um padrão de perda óssea progressiva após a remoção das ligaduras, em contraste com o padrão de perda óssea apresentado pelos WKY, que tendeu a diminuir no 21º dia do experimento. SHR = ratos espontaneamente hipertensos; WKY = ratos Wistar-Kyoto, controle de normotensos; DP = periodontite.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Poucos estudos têm focado no impacto do estado hipertensivo sobre os tecidos periodontais ou avaliado os efeitos da hipertensão no osso alveolar na presença de infecção bacteriana, como a periodontite^{19,20}. E estes estudos avaliaram os efeitos da hipertensão na perda óssea alveolar sob a indução da ligadura, não avaliando os seus efeitos após a remoção das ligaduras.

O método de indução da periodontite por ligadura induz à perda óssea alveolar devido ao acúmulo de biofilme ocasionado pela presença da ligadura na região cervical dos elementos dentais. Assim, uma vez o processo inflamatório sendo iniciado por este método, somente após a remoção da ligadura é que o papel da resposta do hospedeiro na manutenção do processo inflamatório e na progressão da periodontite poderá ser avaliado.

Mais importante, nós acreditamos que este estudo possa ser o primeiro a avaliar o impacto da resposta do hospedeiro sobre a severidade da progressão da periodontite após a remoção das ligaduras, sob uma condição hipertensiva.

Para medir os efeitos da hipertensão no osso alveolar foi escolhido o SHR como modelo experimental. Os SHR vêm mostrando manifestações sistêmicas semelhantes àsquelas dos seres humanos³⁰. Esses animais apresentam alterações hemodinâmicas e endócrinas e manifestações orgânicas que podem aumentar a perda óssea e prejudicar reparo ósseo espontâneo¹⁷. E como controles normotensos foram utilizados os ratos da linhagem *Wistar-kyoto* (WKY), os quais, devido ao fato de terem as mesmas características genéticas que os SHRs, excetuando-se a hipertensão, a linhagem WKY vem sendo utilizada em muitos estudos e considerada como o melhor controle normotenso para os SHR^{29,31}.

Neste estudo, os animais SHR apresentaram uma pressão arterial elevada e sem maiores variações ao longo do experimento, indicando que a condição hipertensiva não foi afetada em nenhuma das fases do estudo, seja com ligadura ou após a sua remoção. Da mesma maneira, não houve mudanças significativas no peso dos animais que pudessem causar, direta ou indiretamente, deficiências nutricionais relevantes e estarem associadas à perda óssea progressiva observada

no grupo SHR-DP. Embora os animais não tenham sofrido variações de peso durante o estudo, foi possível observar que os animais dos grupos WKY apresentaram tamanho e peso corpóreo superiores aos SHR em todas as etapas deste experimento, mesmo apresentando-se na mesma faixa etária.

A análise intra-grupo mostrou uma maior perda óssea nos grupos com DP em comparação aos grupos controle 10 dias após a indução da DP por ligadura (Figura 4), indicando que o método de indução da periodontite por ligadura foi eficiente em promover a doença. Estes resultados estão de acordo com aqueles de Bastos et al (2010)¹⁹ que verificaram uma maior perda óssea na região de furca e também com os de Leite et al (2005)²⁰ que observaram degradação de fibras colágenas e destruição tecidual apenas nos sítios com ligadura. Ambos os estudos supracitados utilizaram o SHR como modelo experimental.

A análise entre-grupos não revelou diferenças significantes na distância COA-JCE (mm) entre os grupos SHR-DP e WKY-DP (Figura 4). Esses resultados também estão de acordo com os apresentados por Bastos et al (2010)¹⁹, que não observaram diferenças entre os SHR e os seus controles normotensos. Entretanto, nesta pesquisa os valores de COA-JCE (mm) demonstraram uma grande perda óssea no grupo WKY-C, em comparação a observada no grupo SHR-C. Acreditamos que esta diferença possa ser devido à variação de tamanho entre os animais SHR e WKY. E ao tratar-se de uma situação onde os grupos controle apresentam diferenças significantes, os valores absolutos de COA-JCE entre os grupos SHR e WKY não podem ser comparados.

Por esta razão, neste estudo, os dados referentes à severidade de perda óssea ocorrida aos 10 e 21 dias (Figura 6), bem como os dados referentes à perda óssea adicional após a remoção das ligaduras (Figura 5), foram apresentados em forma de percentual, como o objetivo de minimizar as variações entre os grupos, normalizando os seus dados e permitir uma comparação entre os grupos WKY e SHR.

Estudos anteriores demonstraram que ratos de diferentes linhagens apresentam padrões diferentes de perda óssea³⁵ e de reparo ósseo após a remoção das ligaduras³⁶.

Neste estudo, também foi avaliada a perda óssea alveolar acumulada 11 dias após a remoção das ligaduras. Optou-se por remover as ligaduras no 10º dia do experimento sem, contudo remover o biofilme dental, pois acreditamos que há a

necessidade de mantê-lo para se avaliar a resposta do hospedeiro na progressão da periodontite. Não foi objetivo deste trabalho, avaliar a resposta dos animais ao tratamento periodontal clássico.

Aos 21 dias, ou seja, 11 dias após a remoção das ligaduras, os grupos com DP mostraram uma perda óssea acumulada maior que a observada em seus controles (Figura 4), indicando que não houve formação óssea após a remoção das ligaduras em nenhuma das linhagens de animais, seja SHR ou WKY. Contudo, a figura 4 mostra uma perda óssea adicional significativamente acentuada entre o 10º e o 21º dias, apenas no grupo SHR-DP. Estes resultados indicam que a perda óssea adicional após a remoção das ligaduras foi mais severa quando a hipertensão estava presente (Figura 5). Esse dado está de acordo com Bastos et al (2010)¹⁹ os quais concluíram que os ratos SHR apresentavam alterações mais severas no osso alveolar, independentemente da presença de processo inflamatório.

Embora os animais WKY tenham demonstrado valores precoces de COA-JCE (mm) maiores que os apresentados pelos SHR, foi possível verificar uma perda óssea mais acentuada no grupo SHR, tanto aos 10 quanto, principalmente, aos 21 dias do experimento, através da observação da diferença de perda óssea entre os grupos com DP e seus respectivos controles (Figura 6). Neste experimento foi observado que os animais hipertensos apresentaram, após a remoção das ligaduras, uma perda óssea mais severa que a apresentada aos 10 dias sob a indução da DP, em comparação a seus controles sem indução da DP. A perda óssea aos 21 dias nos SHR correspondeu a aproximadamente o dobro dos níveis de perda óssea apresentados pelos seus controles.

Esse estudo mostrou que o percentual de perda óssea adicional ocorrida na fase pós remoção das ligaduras (entre o 10º e o 21º dia do experimento) apresentado pelo grupo WKY-DP foi próximo ao observado pelos seus controles, enquanto que o grupo SHR-DP apresentou um percentual de perda óssea adicional superior àquele observado pelos seus controles (Figura 5).

Além da perda óssea no grupo WKY ter sido menos severa que a do grupo SHR, nos dois tempos experimentais, foi possível notar que o padrão de perda óssea ocorrido nos animais normotensos ocorreu de forma inversa ao observado nos SHR, ou seja, a perda óssea nos WKY foi menos acentuada após a remoção das ligaduras que aos 10 dias, em relação aos WKY sem a indução da DP,

enquanto que aquela nos animais hipertensos apresentou uma tendência à perda óssea progressiva após a remoção das ligaduras (Figura 6).

Os resultados da pesquisa em evidência revelaram que a severidade da perda óssea nos ratos SHR foi maior que a dos WKY principalmente aos 21 dias, como mostra a figura 6. Além disso, a hipertensão acarretou na perpetuação da progressão da perda óssea, mesmo após a remoção das ligaduras, fato este não observado nos grupos normotensos, os quais apresentaram menor padrão de perda óssea aos 21 dias (Figuras 4 e 6). Indicando a importância do papel do hospedeiro na progressão da periodontite frente a uma condição hipertensiva.

Possíveis explicações para estas observações podem ser associadas a duas variações orgânicas existentes na presença da hipertensão: (i) as alterações no metabolismo ósseo e (ii) o processo inflamatório sistêmico, os quais podem ter prejudicado o remodelamento ósseo e corroborado com a persistência do processo inflamatório local, levando à perpetuação da perda óssea após a remoção das ligaduras.

Adicionalmente, tem sido demonstrado que os SHR apresentam uma densidade óssea inferior^{17-19,37-39} e que o reparo ósseo em tíbias de SHR também se mostrou prejudicado, quando comparado a ratos normotensos¹⁷. Estas alterações presentes no metabolismo ósseo dos SHR podem ter corroborado como as observações realizadas neste estudo, tendo em vista que mesmo sem apresentar uma perda óssea significativamente superior às do WKY, foi possível observar uma perda óssea mais severa nos SHR, mesmo após a remoção das ligaduras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados neste estudo, foi possível observar duas características importantes relacionadas à periodontite no grupo SHR: (i) a quantidade de perda óssea induzida foi maior durante os primeiros 10 dias da fase com ligadura associado a (ii) um padrão de perda óssea progressiva mais intensa na fase sem ligadura, do 11° ao 21° dia.

Portanto, é possível concluir que a hipertensão, quando associada à presença do biofilme dental, está relacionada a uma perda óssea alveolar mais severa, perpetuando a degradação tecidual mesmo após a remoção da ligadura.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*. Feb 1998;69(2):269-278.
2. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000*. Jun 2000;23:9-12.
3. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. Dec 2003;8(1):12-37.
4. Lakoski SG, Cushman M, Palmas W, Blumenthal R, D'Agostino RB, Jr., Herrington DM. The relationship between blood pressure and C-reactive protein in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J Am Coll Cardiol*. Nov 15 2005;46(10):1869-1874.
5. Sesso HD, Wang L, Buring JE, Ridker PM, Gaziano JM. Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women. *Hypertension*. Feb 2007;49(2):304-310.
6. Kweider M, Lowe GD, Murray GD, Kinane DF, McGowan DA. Dental disease, fibrinogen and white cell count; links with myocardial infarction? *Scott Med J*. Jun 1993;38(3):73-74.
7. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol*. Feb 1997;107(2):347-352.
8. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the

- peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol.* Oct 2000;71(10):1528-1534.
9. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* Feb 2004;83(2):156-160.
 10. Vidal F, Figueredo CM, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol.* May 2009;80(5):786-791.
 11. Holmlund A, Holm G, Lind L. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and hypertension in a study based on 4,254 subjects. *J Periodontol.* Jul 2006;77(7):1173-1178.
 12. Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, et al. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. *Hypertension.* Mar 2003;41(3):488-492.
 13. Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int.* Dec 1985;37(6):605-607.
 14. Jespersen B, Randlov A, Abrahamsen J, Fogh-Andersen N, Kanstrup IL. Effects of PTH(1-34) on blood pressure, renal function, and hormones in essential hypertension: the altered pattern of reactivity may counteract raised blood pressure. *Am J Hypertens.* Dec 1997;10(12 Pt 1):1356-1367.
 15. Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet.* Sep 18 1999;354(9183):971-975.

16. Nobre MD, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Local action of sodium alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Arq Bras Cardiol.* Apr 2008;90(4):239-246.
17. Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res.* Apr-Jun 2010;24(2):170-176.
18. Manrique N, Pereira CSS, Garcia LMG, Micaroni S, Carvalho AAF, Perri SHV, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali, C. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR): a radiographic densitometry study. . *J Appl Oral Sci.* 2011 (in press).
19. Bastos MF, Brilhante FV, Goncalves TE, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol.* Jul 2010;81(7):1075-1083.
20. Leite CL, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* Aug 2005;27(6):523-531.
21. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* Jul 2005;49(3):551-571, vi.
22. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* Aug 2006;41(4):354-360.
23. Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension.* Feb 2008;51(2):446-453.

-
24. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol*. Jul 2009;80(7):1021-1032.
 25. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. Jul 1 2009;104(1):59-68.
 26. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 1 2003;23(2):168-175.
 27. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. Jun 15 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
 28. Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens*. Mar 2008;26(3):381-391.
 29. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. May 1992;19(5):425-427.
 30. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. Mar 1981;48(3):309-319.
 31. Zhang YF, Wang YX, Griffith JF, et al. Proximal femur bone marrow blood perfusion indices are reduced in hypertensive rats: a dynamic contrast-enhanced MRI study. *J Magn Reson Imaging*. Nov 2009;30(5):1139-1144.
 32. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*. 1966;1(3):193-204.

-
33. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.* Jan 2006;85(1):15-21.
 34. Coimbra LS, Rossa C, Jr., Guimaraes MR, et al. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *J Periodontol.* May 2011;82(5):767-777.
 35. Schreiner H, Markowitz K, Miryalkar M, Moore D, Diehl S, Fine DH. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bone loss and antibody response in three rat strains. *J Periodontol.* Jan 2011;82(1):142-150.
 36. Liu R, Bal HS, Desta T, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* Jun 2006;85(6):510-514.
 37. Barbagallo M, Raddino R, Restori G, Boiardi L, Novo S, Strano A. Alterations of calcium metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience.* Jun 1990;1(2):105-107.
 38. Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience.* Mar 1991;2(1):15-17.
 39. Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* Dec 1995;22(1):S242-243.

APÊNDICE

APÊNDICE – Artigo**Hypertension Perpetuates Alveolar Bone Loss**

Janine Montenegro Toscano Moura de Medeiros VANDERLEI^a, Michel Reis MESSORA^b, Patrícia Garani FERNANDES^c, Daniela Bazan PALIOTO^b, Marcio Fernando de Moraes GRISI^b, Sergio Luis Scombatti de SOUZA^b, Arthur B. NOVAES JR^b, Raquel Fernanda GERLACH^d, Cristina ANTONIALI^e, Mario TABA JR^b

^aDDS, Graduate Student of Department of Oral Surgery and Periodontology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo

^bDDS, MSc, PhD, Department of Oral Surgery and Periodontology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

^cDDS, MSc, Graduate Student of Department of Oral Surgery and Periodontology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo

^dDDS, MSc, PhD, Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

^eMS, PhD, Department of Basics Science, Schol of Dentistry of Araçatuba, UNESP - Univ. Estadual Paulista.

This study was supported by State of São Paulo Research Foundation FAPESP, Brazil (n°. 2007/07007-2).

The authors report no conflicts of interest related to this study

Corresponding author and responsible for reprints:

Mario Taba Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Avenida do Café - s/n, zip: 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br; fax number: +55-16-3602-4788.

ABSTRACT

Objective: Few studies have focused on the impact of hypertension on the progression of periodontitis (PD). The purpose of this study was to evaluate whether hypertension affects PD by enhancing bone loss even after ligature removal.

Methods: Using a ligature-induced periodontitis model, 20 *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) and 20 normotensive rats (*Wistar Kyoto* - WKY) were assigned to one of the following groups: WKY-C, WKY-PD, SHR-C and SHR-PD (C – control group, and PD – periodontitis group). On PD groups, the first mandibular molar received a cotton ligature at baseline. After 10 days, 5 animals of each group were sacrificed and the ligatures of the other animals were removed. On the 21th day (11 days without ligatures), the remaining animals were sacrificed. The jaws were defleshed and the distances between alveolar bone crest and cemento-enamel junction (ABC-CEJ, mm) were measured in all groups.

Results: After 10 days, the PD groups showed an increased bone loss ($p < 0.05$) than the controls (SHR-PD = 0.72 ± 0.05 ; SHR-C = 0.39 ± 0.04 ; WKY-PD = 0.75 ± 0.04 and WKY-C = 0.56 ± 0.04 mm). After ligature removal, the cumulative bone loss was worse than that one at 10 days with ligature only in SHR-PD group ($p < 0.05$) (0.94 ± 0.13 mm). The SHR animals showed a pattern of bone loss more severe than WKY after ligature removal (102% and 26%, respectively), and a tendency of a progressive bone loss after ligature removal. **Conclusion:** Therefore, it may be speculated that the hypertension is associated with a higher progressive bone loss even after ligature removal.

Key words: Periodontitis; Hypertension; Alveolar bone loss; SHR.

INTRODUCTION

Periodontitis (PD) is an inflammatory disease that affects the supporting bone around the teeth, leading to tooth loss ¹. It is a very prevalent disease, which afflicts over 50% of the adult population in the United States, with approximately 10% displaying severe disease concomitant with early tooth loss ². Although the initiation of periodontitis are dependent on the presence of bacterial challenge, the host response to bacterial attack is critical to periodontal inflammation progression and severity of bone loss ¹.

Studies show that systemic diseases such as diabetes, hyperthyroidism, osteoporosis, dyslipidemia and cardiovascular disease may influence periodontal inflammation. Some experimental and epidemiological studies have showed that hypertension impaired bone density and quality ³⁻⁶, and there was a correlation between hypertension and teeth survival ⁷.

Hypertension is a very prevalent and multi-factorial condition, characterized by increased peripheral vascular resistance due to a vascular remodeling ^{8,9}.

The relation between hypertension and periodontitis could involve the systemic inflammatory process due to endothelial dysfunction, which is the initial step in the development of hypertension and atherosclerosis, leading to cardiovascular disease. Endothelial dysfunction disturbs the physiological protective regulatory balance by a decrease in Nitric Oxide ¹⁰ and increasing blood levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and C-reactive protein (CRP) ⁴.

Moderate to severe periodontitis may affect systemic inflammatory and immune biomarkers such as CRP, IL-6 and TNF- α ¹¹. In addition, periodontal therapy reduces blood levels of these biomarkers in patients with hypertension ¹².

Studies have shown that hypertension also affects the systemic calcium metabolism by the secondary activation of the parathyroid hormone, leading to the activation of osteoclasts and decelerates osteoblastic differentiation and increased mobilization of calcium from bone ^{5,9}. This alterations presents on hypertension results on a decrease of bone mineral density and impaired bone repair, both in human and in *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) ^{6,9,13}.

Despite the evidences, few studies focused on the impact of the hypertensive status on the periodontal tissues and evaluated the effect of elevated blood pressure

on the alveolar bone in the presence of infectious challenge ^{5,14}. It has been demonstrated that spontaneously hypertensive rats presented harmful alterations in alveolar bone quality ^{5,14}. Those studies ^{5,14} focused on bone loss without evaluating alveolar bone loss after ligature removal. And the role of host response on PD progression only may be evaluated after ligature removal.

In view of the prevalence of hypertension and the importance of periodontal tissue support to health quality, the purpose of this study was to evaluate, morphometrically, i) whether hypertension affects alveolar bone loss induced by ligature and ii) the importance of the host response on PD progression after ligature removal, in hypertensive rats.

METHODS

Animals

For this study, 20 male *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) and 20 normotensive male rats (*Wistar Kyoto* - WKY) were assigned to one of the following groups: WKY-C, WKY-PD, SHR-C and SHR-PD (C – control group, and PD – periodontitis group).

The research protocol was previously approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use at University of São Paulo - Ribeirão Preto, Brazil (protocol number: 10.1.379.53.2). The animals were housed in groups of five rats per cage, in a room with a 12-hour light/dark cycle and temperature between 22°C and 24°C, and had free access to standard rat chow and drinking water *ad libitum*, in the Bioscience Laboratory of School of Dentistry at Ribeirão Preto of University of São Paulo, Brazil.

Experimental design and induction of PD

The animals of PD groups were submitted to a general anesthesia by intraperitoneal administration of xylazine^{§§} (8 mg/kg) and ketamine^{***} (75 mg/Kg), and its first mandibular molar received a cotton ligature at baseline. It has previously been shown that placement of the ligature facilitates bacteria-induced inflammation and

^{§§} Dopaser, Herpate Calier, Juatuba – MG, Brazil.

^{***} Agener, São Paulo – SP, Brazil.

periodontal tissue loss¹⁵. This experimental periodontitis-induced protocol is widely used on literature.

After 10 days, 5 animals of each group (WKY-C, WKY-PD, SHR-C and SHR-PD) were sacrificed, to evaluating bone loss, and the ligatures of the other animals of PD groups were removed. On the 21th day of the experiment, 11 days without ligatures, the remaining animals of all groups were sacrificed to evaluating bone alteration after ligature removal, and the importance of the host response on PD progression. The experimental design to evaluating PD progression was previously described^{16,17}.

The animals were sacrificed 10 or 21 days later ligatures placement by an excess of anesthetic, to measure its alveolar bone level by morphometric analysis.

Body weight and blood pressure were measured weekly. The systolic blood pressure (SBP) was assessed by tail-cuff pletismography, and rats were considered to be hypertensive when SBP was higher than 150 mmHg.

Measurement of alveolar bone level

After the rats were sacrificed, the rat jaws were excised, biologically and chemically defleshed, and stained with 1% aqueous methylene blue in order to differentiate bone from teeth and enhance the visibility of the cemento enamel junction (CEJ).

Using a stereomicroscope^{†††} with a color video camera mounted on it and coupled in a computer, the lingual surfaces of the defleshed jaws were recorded in a standardized manner (20 X magnification).

The distance between alveolar bone crest and cemento enamel junction (ABC-CEJ – mm) was measured in the distal root surface of the first molar, mesial root surface of the second molar and in the central point of the interproximal area between the 1st and 2nd molars (Figure 1), using an image analysis software^{‡‡‡}. In order to avoid error, it was used the average of the three measures for analysis.

Statistical analysis

All data are expressed as means $\pm$ standard error of the means (SEM). For statistical analysis, it was used the mean of the three ABC-CEJ measured in each

^{†††} Leica MZ6, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany.

^{‡‡‡} Image J - National Institutes of Health, Washington, DC, USA.

sample. Differences among the groups were analyzed by a two-way analysis of variance (Two-way ANOVA) followed by Duncan test for multiple comparisons and values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The effects of hypertension on PD were monitored by measuring the bone loss using a ligature-induced periodontitis model and also evaluating the alveolar bone loss after ligature removal in hypertensive rats. During the experiment, no significant body weight changes were observed on the groups. It was observed a superior average of body weight on WKY groups (334.5 ± 8.1 g) compared to SHR groups (247.1 ± 5.3 g). As expected, all animals in SHR groups presented elevated blood pressure. The SBP mean level for SHR groups was 192.7 ± 1.1 mmHg and for WKY groups was 120.7 ± 1.6 mmHg.

Measurement of alveolar bone level

To evaluate the impact of hypertension on bone alterations in progressive periodontitis, the distance between alveolar bone crest and cemento-enamel junction (ABC-CEJ, mm) was measured in three points of interproximal area between the 1st and 2nd molar in hypertensive rats (SHR) (Figure 1). For comparison reasons, it was used *Wistar Kyoto* rats (WKY) as a normotensive control, as described in material and methods section.

The intragroup analysis revealed that after 10 days of ligature induced periodontitis, PD groups showed increased ($p < 0.05$) bone loss (ABC-CEJ values) than the controls ($p < 0.05$) (SHR-PD = 0.72 ± 0.05 ; SHR-C = 0.39 ± 0.04 ; WKY-PD = 0.75 ± 0.04 and WKY-C = 0.56 ± 0.04 mm). There was no difference ($p > 0.05$) between SHR-PD and WKY-PD groups on the intergroup analysis (Figure 2).

After 21 days, PD groups showed superior cumulative bone loss than the control groups ($p < 0.05$), however no difference was observed between SHR-PD and WKY-PD groups ($p > 0.05$). The ABC-CEJ values of each group were: SHR-PD = 0.95 ± 0.13 ; SHR-C = 0.47 ± 0.04 ; WKY-PD = 0.88 ± 0.04 and WKY-C = 0.70 ± 0.04 mm ($p < 0.05$) (Figure 2). After ligature removal it was observed an increased additional bone loss only on SHR-PD group ($p < 0.05$) (Figure 2).

To evaluate the disease progression after ligature removal it was observed the additional bone loss by calculating the difference of distance ABC-CEJ (mm) between 10 and 21 days. The values were: SHR-PD = 0.23; SHR-C = 0.08; WKY-PD = 0.13 and WKY-C = 0.13, mm. Figure 3 shows a percentage of additional bone loss, between 10 and 21 days, in WKY-PD group (17%) similar to that presented by its respectively control (23%), while SHR-PD (32%) exhibited more additional bone loss than SHR-C (19%).

The severity percentage of bone loss in SHR group was superior to WKY group by measuring the difference of ABC-CEJ between PD and control groups, mainly at the 21^o day (102% and 26%, respectively) (Figure 4). The respectively values calculated for SHR and WKY were 0.32 and 0.18 mm at 10 days; 0.40 and 0.18 mm at 21 days.

Additionally, it was observed a different pattern of bone loss in WKY and SHR after ligature removal. WKY showed a diminished trend of bone loss, whilst SHR exhibited a progressive pattern of bone loss (Figure 4).

DISCUSSION

Few studies have focused on the impact of the hypertensive status on the periodontal tissues and evaluated the effect of hypertension on the alveolar bone in the presence of infectious challenge such as periodontitis ^{5,14}. However, those studies ^{5,14} only evaluated the effects of hypertension on periodontal tissues with ligature presence, and did not assessed these effects after ligature removal.

More important, the role of host response on periodontitis progression only could be evaluated after ligature removal. Moreover, we believe this is the first investigation on the impact of host response on the severity of PD progression even ligature removal, in hypertensive rats.

In order to measure the effects of the hypertensive condition on alveolar bone it was chosen the SHR as the experimental animal model. The SHR have shown systemic manifestations similar to the human disorder ¹⁸. These animals present hemodynamic, endocrine and end-organ manifestation that may enhance bone loss and impair bone repair ⁹.

As a normotensive control, it was used the wistar-kyoto strain. Because SHR and WKY have the same genetic background except hypertension, the WKY strain has been used in most of studies and accepted as the most appropriate normotensive control for SHR ^{19,20}.

In this study, the SHR group showed a very consistent high blood pressure level throughout the study, indicating that the hypertensive condition affected negatively in both ligature and no-ligature phases of the study. At the same way, there were no significant weight changes that could directly or indirectly cause relevant nutritional deficiencies to be associated to progressive bone loss.

Although animals' body weight had not changed during the study on intragroup analysis, it was observed that SHR were smaller and light than WKY at all phases of the experiment, even presenting the same age. In the intragroup analysis the PD groups showed superior bone loss after 10 days of ligature placement compared to control groups (Figure 2), indicating that the ligature method was efficient to induces periodontitis. This result is according to Bastos et al. (2010) ⁵ that verified more bone loss on the furcation area and Leite et al. (2005) ¹⁴ that observed collagen degradation only in the ligated sites, both studies used SHR model.

The intergroup analysis revealed no significant difference in ABC-CEJ distance, mm, between SHR-PD and WKY-PD groups were observed, these observations are according to Bastos et al. (2010) ⁵. However in this study it can be observed that ABC-CEJ values, mm, in WKY-C group were higher than that observed in SHR-C group. We believe that this difference of bone loss in SHR-C and WKY-C groups may be occurred due to body size disparity between WKY and SHR animals. And on a situation where the control groups indicate a statistical difference, the absolute values of COA-CEJ, mm, between SHR and WKY cannot be compered.

Because of it, in this study, data concerning to bone loss severity (Figure 4), as well as data of additional bone loss after ligature removal (Figure 3) were presented in percentage, in order to minimize variations between groups and normalizing data.

Although the WKY demonstrated higher values of ABC-CEJ in comparison to SHR, it was possible to observe that the progressive bone loss was more evident in SHR group, at 10 and mainly at 21 days (Figure 4).

At 21th day – eleven days without ligatures, PD groups showed increased cumulative bone loss than the control groups, indicating that neither SHR nor WKY

presented bone formation at no-ligature phase of the study. However, figure 2 shows a higher bone loss between 10 and 21 days only in SHR-PD group. These results indicate that bone loss after ligature removal was more severe when the hypertensive condition was present. This result is according to Bastos et al. (2010)⁵ which concluded that SHR presented severe alterations on alveolar bone independently of inflammation.

This study showed that the percentage of additional bone loss after ligature removal on WKY-PD group was similar to that one presented by WKY-C, while SHR-PD exhibited a superior additional bone loss than its control group (Figure 3).

In addition to bone loss has been more severe in SHR-PD group, at 10th day and mainly after ligature removal, the pattern of PD progression occurred on an inverse way in SHR and WKY groups. After ligature removal WKY demonstrated a diminished trend of bone loss, in contrast to SHR that exhibited a progressive pattern of bone loss (Figure 4).

Previous studies have shown that different strains of rats had different pattern of bone loss²¹ and bone healing after the ligature removal²².

The results of this study revealed that SHR animals presented more severe bone loss than WKY, as shown in figure 4. In addition, hypertension perpetuated the alveolar bone loss progression, even after ligature removal contrasting to the normotensive group, which had a lower pattern of bone loss at 21 days, indicating the role of the host response on PD progression, under a hypertensive condition (Figure 4).

Possible explanations for these observations can be linked to both organic changes in hypertensive organisms: (i) changes in bone metabolism and (ii) systemic inflammatory process, which may have impaired bone remodeling and corroborated to the persistence of local inflammatory process and perpetuates the bone loss after bacteria challenge removal.

Additionally, it has been demonstrated that SHR presented lower bone density^{5,6,9,23-25} and impaired bone healing in tibia defects compared to normotensive rats⁹.

Based on the results, we observed two important characteristics related to periodontitis in the SHR group: (i) the amount of induced bone loss was higher during the first 10 days of the ligature-induced phase with a (ii) progressive pattern of bone loss after ligature removal from day 11 to 21. Therefore, it may be speculated that the

hypertension, when related to biofilm presence, is associated to a severe bone loss and perpetuates periodontal tissue degradation even after ligature removal.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Raquel Carros Antonio, Adriana L. Almeida, Kléber Tanaka Suzuki and Ana Carolina O. Souza from Ribeirão Preto School of Dentistry, Adriana M. M. Silveira e Souza from Ribeirão Preto Medicine School for their invaluable contributions to this study. This study was supported by State of São Paulo Research Foundation FAPESP, Brazil (n°. 2007/07007-2). The authors declare no conflicts of interests related to this study.

REFERENCES

1. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* Jul 2005;49(3):551-571, vi.
2. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000.* 2002;29:31-69.
3. Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, et al. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. *Hypertension.* Mar 2003;41(3):488-492.
4. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol.* Jul 2009;80(7):1021-1032.
5. Bastos MF, Brilhante FV, Goncalves TE, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol.* Jul 2010;81(7):1075-1083.
6. Manrique N, Pereira CSS, Garcia LMG, Micaroni S, Carvalho AAF, Perri SHV, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali, C. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR): a radiographic densitometry study. *J Appl Oral Sci.* 2011 (in press).
7. Holmlund A, Holm G, Lind L. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and

hypertension in a study based on 4,254 subjects. *J Periodontol.* Jul 2006;77(7):1173-1178.

8. Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens.* Mar 2008;26(3):381-391.
9. Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res.* Apr-Jun 2010;24(2):170-176.
10. Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension.* Feb 2008;51(2):446-453.
11. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* Feb 2004;83(2):156-160.
12. Vidal F, Figueredo CM, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol.* May 2009;80(5):786-791.
13. Nobre MD, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Local action of sodium alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Arq Bras Cardiol.* Apr 2008;90(4):239-246.
14. Leite CL, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* Aug 2005;27(6):523-531.
15. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res.* 1966;1(3):193-204.
16. Coimbra LS, Rossa C, Jr., Guimaraes MR, et al. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *J Periodontol.* May 2011;82(5):767-777.
17. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.* Jan 2006;85(1):15-21.
18. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res.* Mar 1981;48(3):309-319.
19. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* May 1992;19(5):425-427.

20. Zhang YF, Wang YX, Griffith JF, et al. Proximal femur bone marrow blood perfusion indices are reduced in hypertensive rats: a dynamic contrast-enhanced MRI study. *J Magn Reson Imaging*. Nov 2009;30(5):1139-1144.
21. Schreiner H, Markowitz K, Miryalkar M, Moore D, Diehl S, Fine DH. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bone loss and antibody response in three rat strains. *J Periodontol*. Jan 2011;82(1):142-150.
22. Liu R, Bal HS, Desta T, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. Jun 2006;85(6):510-514.
23. Barbagallo M, Raddino R, Restori G, Boiardi L, Novo S, Strano A. Alterations of calcium metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. Jun 1990;1(2):105-107.
24. Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. Mar 1991;2(1):15-17.
25. Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. Dec 1995;22(1):S242-243.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Photographs of the defleshed jaw after methylene blue staining.

Illustrative measurement of bone loss of control (A) and PD groups (B) - 20 x magnification. Appreciate the amount of bone loss in the PD group (B) consisting of apical migration of the bone crest and exposure of interdental and furcation areas. The distance between alveolar bone crest (ABC) and cementoenamel junction (CEJ) was measured in three points of the interproximal area between the first and second molar (yellow lines). The mean $\pm$ SEM of the three measures was calculated for the statistical analysis.

Figure 2: Bone levels for SHR and WKY groups. The measurements indicate the average distance ABC-CEJ (mm) of SHR and WKY, 10 and 21 days after ligature placement. The measures at 21 days correspond to the effect of 10 days of ligature periodontitis-induced period and the additional 11 days without ligature. The intragroup analysis shows a superior bone loss on PD groups compared to control groups. The analysis of PD progression after ligature removal, occurred between 10th and 21th days, revealed a bone loss progression only on SHR-PD ($p < 0.05$). The bars represent the mean $\pm$ SEM of ABC-CEJ (mm) in the interproximal area between the first and second molar. * $p < 0.05$ was considered statistically significant (Two-way ANOVA and Duncan test). ABC-CEJ = alveolar bone crest – cementoenamel junction; SHR = spontaneously hypertensive rats; WKY = wistar kyoto – normotensive control.

Figure 3: Percentage of progressive bone loss after ligature removal. The graph illustrates the contribution of each group to the total amount of additional bone loss after ligature removal. The additional bone loss percentage was calculated by the difference of means of ABC-CEJ (mm) between days 10 and 21. The percentage of additional bone loss in WKY-PD group (17%) was similar to that one presented by WKY-C (23%), while SHR-PD (32%) exhibited a superior additional bone loss than SHR-C (19%). ABC-CEJ = alveolar bone crest – cementoenamel junction; SHR = spontaneously hypertensive rats; WKY = wistar kyoto – normotensive control; PD = periodontitis group; C= control group.

Figure 4: Severity of Alveolar Bone Loss (%). Percentage difference of bone loss between PD and control groups, at 10 and 21 days. The SHR group presented more severe bone loss compared to WKY groups mainly at 21th day, 11 days after ligature removal. After ligature removal, WKY showed a diminished trend of bone loss, while SHR exhibited a progressive pattern of bone loss. SHR = spontaneously hypertensive rats; WKY = wistar kyoto – normotensive control.

Figure1:

Figure 2:

Figure 3:

Figure 4:

ANEXO

ANEXO – Protocolo do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.379.53.2), intitulado "Modulação da Resposta Inflamatória em Ratos Hipertensos com Periodontite", de autoria de **Janine Montenegro Moura de Medeiros Vanderlei**, e de **Mário Taba Junior** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.379.53.2), entitled: "Modulação da Resposta Inflamatória em Ratos Hipertensos com Periodontite", by **Janine Montenegro Moura de Medeiros Vanderlei** and **Mário Taba Junior**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 07, 2010.

Ribeirão Preto, 8 de outubro de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro