

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

PAULA KATHERINE VARGAS SANCHEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

PONTA GROSSA 2015

PAULA KATHERINE VARGAS SANCHEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, no curso de
Mestrado em Odontologia – Área de
concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre
Franco

PONTA GROSSA 2015

PAULA KATHERINE VARGAS SANCHEZ

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA
POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 24 de novembro de 2015

Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Reila Tainá Mendes
Universidade São Leopoldo Mandic

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

V297 Vargas Sanchez, Paula Katherine
 Caracterização do modelo de perda óssea
 alveolar induzida por ligadura em ratos/
 Paula Katherine Vargas Sanchez. Ponta
 Grossa, 2015.
 55f.

 Dissertação (Mestrado em Odontologia -
 Área de Concentração: Clínica Integrada),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar
 Nobre Franco.

 1.Modelo animal. 2.Ligadura. 3.Perda
 óssea alveolar. I.Franco, Gilson Cesar
 Nobre. II. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Odontologia. III. T.

CDD: 617.632

Dedico este trabalho...

A meus pais, por seu amor, dedicação e apoio incondicional nestes dois anos de mestrado longe de casa. Sem eles este sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

À minha família, por acreditar em mim, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, por sua orientação, pelo tempo dedicado, paciência e pelos conhecimentos transmitidos nestes dois anos.

À Marcella Goetz Moro, por sua amizade e ajuda neste estudo.

À Naiana Mello Cançado, por sua amizade e apoio incondicional, e por me acolher em sua família.

DADOS CURRICULARES
Paula Katherine Vargas Sanchez

NASCIMENTO 19.10.1990

BOGOTÁ DC – COLÔMBIA

FILIAÇÃO

Adelmo Vargas Montaña
Rosa Maria Sanchez Cardenas

2007 – 2013

Curso de Graduação
Universidade Nacional da
Colômbia (UNAL). Bogotá –
Colômbia

2014 – 2016

Curso de Pós-graduação em
Odontologia, Universidade
Estadual de Ponta Grossa –
UEPG, nível de Mestrado em
Odontologia - Área de
Concentração em Clínica
Integrada.

RESUMO

A pesquisa na área da periodontia envolve o uso de modelos animais para facilitar o entendimento de processos biológicos envolvidos na doença periodontal (DP) e o potencial das terapias novas e já existentes. Na literatura, o modelo mais utilizado para a indução da DP em ratos é a ligadura. Nesta metodologia há a inserção de um fio de algodão na região cervical de molares (inferiores e/ou superiores), promovendo assim um acúmulo de um biofilme bacteriano, o qual desencadeia uma resposta inflamatória local e a consequente perda óssea alveolar (POA). As metodologias mais utilizadas para avaliar a POA são: radiográfica, morfométrica e histológica. Embora estas metodologias sejam amplamente utilizadas, não há na literatura a avaliação de sua confiabilidade por meio de testes estatísticos de concordância, dificultando assim a extrapolação dos dados entre diferentes grupos de pesquisas ou até mesmo dentro um mesmo grupo. Em acréscimo, considerando que cada metodologia de avaliação da perda óssea analisa uma região específica (crista mesial e rebordo alveolar) e que o processo inflamatório é dinâmico, torna-se plausível que a perda óssea, bem como os marcadores da inflamação possuam uma cinética peculiar de evolução de acordo com o tempo de indução da DP. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a concordância de Bland-Altman para as principais metodologias de avaliação da POA (radiográfica, morfométrica e histológica) e caracterizar a cinética da POA, migração leucocitária e do óxido nítrico nos tempos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a indução da DP por meio do método da ligadura. Para isso, 60 ratos Wistar machos entre 250g e 300g foram divididos randomizadamente em 6 grupos experimentais (n=10 animais/grupo), sendo: G0 (sem ligadura), G3 (ligadura por 3 dias), G7 (ligadura por 7 dias), G15 (ligadura por 15 dias), G30 (ligadura por 30 dias) e G60 (ligadura por 60 dias). Após os tempos experimentais, os animais foram sacrificados e as hemimandíbulas removidas para determinação da POA por meio das metodologias: (1) radiográfica, (2) morfométrica (através das medidas linear e da área) e (3) histológica. Além disso foi coletado o tecido gengival adjacente à ligadura do primeiro molar inferior para as análises de migração leucocitária e quantificação de óxido nítrico. Concordância de Bland-Altman foi utilizada para a determinação da confiabilidade (intra e inter-examinador) para as diferentes metodologias de análise da POA. ANOVA seguido do teste de Tukey foi empregado para as avaliações de cinética da POA, da migração leucocitária e do óxido nítrico. O nível de significância foi de 5%. Na análise radiográfica foi observada POA estatisticamente significativa (em relação ao tempo 0) após o terceiro dia. A análise de concordância intra e inter-examinador mostrou diferença significativa entre as mensurações. Na análise morfométrica linear, a POA foi significativa

após o terceiro dia, enquanto que na mensuração da área foi significativa apenas após o sétimo dia. A análise de concordância intra- e inter-examinador não mostrou diferença entre estas mensurações. Na mensuração histológica, a POA foi significativa após o sétimo dia. A análise intra e inter-examinador não mostrou diferença entre as mensurações. A migração leucocitária teve diferença significativa no sétimo dia, coincidindo neste, o seu pico de migração no tecido gengival. Para o óxido nítrico, embora o primeiro tempo de atividade com diferença significativa tenha sido com 7 dias, o seu pico de quantificação ocorreu no décimo quinto dia. Conclui-se que as análises radiográfica e morfométrica linear, apresentaram uma POA significativa em torno do terceiro dia, em contraste as análises morfométrica da área e histológica que mostraram uma POA significativa somente após o sétimo dia da indução da DP. O pico de migração leucocitária ocorre após sete dias da indução da doença, enquanto que para o pico de dosagem do óxido nítrico ocorre somente no décimo quinto dia. Em acréscimo foi observada uma concordância de Bland Altman intra e inter-examinador para as metodologias morfométricas e histológicas. Porém a metodologia radiográfica não apresentou concordância intra nem inter-examinador.

Palavras chave: Modelo animal, Ligadura, Perda óssea alveolar.

ABSTRACT

Periodontal research involves the use of animal models to facilitate the understanding of biological processes of periodontal disease (PD), and the potential of new and existing therapies, therefore the induction of periodontal disease is needed. In the literature, the most widely used model for the induction of periodontal disease in rats is ligature. It is an insertion of a cotton yarn around the cervix of the first mandibular molar resulting in the accumulation of a bacterial biofilm, and triggering a local inflammatory response and the consequent alveolar bone loss (ABL). The methods most commonly used to evaluate the ABL are radiographic, histologic and morphometric. Which measure the distance between the cemento-enamel junction and bone crest. Although these methods are widely used, it is unknown the possibility of extrapolating results between research groups and the intra-examiner (repeatability) and inter-examiner (reproducibility) agreement. Other parameters usually assessed are leukocyte migration (MPO) and the presence of nitric oxide (NO), which are inflammatory markers. The aim of this study was characterized the kinetics of the ABL, leukocyte migration and nitric oxide at 0, 3, 7, 15, 30 and 60 days after induction of PD by ligature and evaluate the Bland-Altman concordance for the main assessment methodologies of ABL (radiographic, histologic and morphometric). 60 male Wistar rats between 250 and 300 g were randomly divided into 6 experimental groups (n = 10 animals / group) as follows: G0 (not treatment), G3 (ligature for 3 days) G7 (ligature for seven days) , G15 (ligature for 15 days), G30 (ligature for 30 days) and G60 (ligature for 60 days). After 0, 3, 7, 15, 30 and 60 days, animals were sacrificed by anesthetic overdose, and hemimandibles were removed for radiographic analysis, morphometric (linear and area) and histological. Also was collected adjacent gum tissue from mandibular first molar for leukocyte migration analysis and nitric oxide dosage. The results were analyzed with ANOVA followed by Tukey test and Bland Altman test to establish the correlation between the methodologies. In the radiographic analysis was observed a significant ABL after the third day, the intra-examiner and inter-examiner analysis showed a significant difference between the measurements. In linear morphometric analysis, the ABL was significant after the third day, in contrast to measure the area was significant only after the seventh day. The concordance analysis intra and inter-examiner did not show difference between these measurements. In histological measurement, the ABL was significant after the seventh day. The intra and inter-examiner analysis showed no difference between the measurements. The leukocyte migration had significant difference on the seventh day and the nitric oxide showed a peak of activity in the fifteenth day. It is concluded that radiographic analysis and morphometric-linear had a significant ABL on the third day, in contrast to morphometric-area and histological showed a significant ABL after the seventh day of induction. The peak of MPO activity occurs seven days after the induction of disease, for NO the peak occurs on the fifteenth day. In addition it was observed an agreement of Bland Altman intra and inter-examiner for the morphometric and histological

methods. But the radiographic method did not show intra- and inter-examiner concordance.

Key words: Animal model, Ligature, Alveolar bone loss.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Prevalência (proporção) mundial de periodontite crônica severa na idade suscetível	18
Figura 2. Prevalência (proporção) e incidência da periodontite crônica severa	19
Figura 3. Patogênese da doença periodontal	20
Figura 4. Área da palma da mão (72cm ²) equivalente à área da bolsa periodontal	21
Figura 5. Importância e aporte do uso de modelos animais em pesquisa	22
Figura 6. Procedimento cirúrgico de ligadura	28
Figura 7. Análise radiográfica	29
Figura 8. Análise morfométrica	30
Figura 9. Análise histológica	31
Figura 10. Repetitividade (Bland Altman)	35
Figura 11. Reprodutibilidade (Bland Altman)	36
Figura 12. Cinética da perda óssea alveolar	38
Figura 13. Cinética da resposta inflamatória	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos modelos animais usados em pesquisa na área da periodontia	23
Tabela 2. Divisão dos grupos	27
Tabela 3. Correlação de Pearson entre as metodologias de avaliação da perda óssea alveolar	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética do uso de Animal
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
DP	Doença periodontal
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
g	Gramas
HE	Hemtoxilina Eosina
IL-1	Interleucina 1
IP	Intraperitoneal
JAC	Junção amelo-cementaria
kg	Quilogramas
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	Miligramas
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros quadrados
MMP	Metaloproteinase de matriz
nm	Nanômetros
NO	Oxido Nítrico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
POA	Perda óssea alveolar
RANKL	Fator nuclear kappa B ligante
rpm	Rotações por minuto
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Vol	Volume
μ l	Microlitros

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
α	Alfa
β	Beta

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA	18
	2.1 Doença Periodontal	18
	2.2 Modelos animais	21
	2.3 Indução da doença periodontal em ratos	23
	2.4 Avaliação da perda óssea alveolar	24
	2.5 Concordância Bland Altman	25
3	PROPOSIÇÃO	26
	3.1 Geral	26
	3.2 Especifico	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
	4.1 Animais e considerações éticas	27
	4.2 Divisão dos grupos	27
	4.3 Procedimento cirúrgico	28
	4.4 Análise radiográfica	29
	4.5 Análise morfométrica	29
	4.6 Análise histológica	30
	4.7 Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase	31
	4.8 Quantificação do Nitrito	32
	4.9 Determinação da Concordância de Bland-Altman	32
	4.10 Análise estatística	33
5	RESULTADOS	34
	5.1 Concordância de Bland Altman das metodologias	34
	5.2 Correlação entre as metodologias	37
	5.3 Cinética da perda óssea alveolar	37
	5.4 Cinética da resposta inflamatória	39
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	44
8	REFERÊNCIAS	45
9	ANEXO A	55

1. INTRODUÇÃO

Na Ciência Periodontal, o uso de modelos animais é de extrema importância uma vez que pesquisas em humanos são, muitas vezes, limitadas pela dificuldade de estabelecer relações causais com a destruição observada nos tecidos de suporte e sustentação do dente (Pihlstrom et al.¹ 2005, Aguirre et al.² 2012). Os modelos animais permitem estabelecer fatores etiológicos da doença e sua relação com fatores externos, além da avaliação do potencial de novas terapias (Struillou et al.³ 2010). Porém, o critério de seleção do modelo e de suas variáveis de análise irá depender principalmente do objetivo do estudo a ser realizado (Aguirre et al.² 2012).

O rato é o roedor mais utilizado para estudar a patogênese da doença periodontal (DP), pois a estrutura tecidual da área periodontal e suas patologias são muito similares às observadas em seres humanos (Struillou et al.³ 2010). Para a indução da doença no rato, na literatura são reportados diferentes métodos como: a inserção de um fio de algodão (ligadura) na região cervical dos molares; a aplicação local de lipopolissacarídeos (LPS) e a infecção por periodontopatógenos (Nociti et al.⁴ 2000, Benatti et al.⁵ 2003, Bezerra et al.⁶ 2008). O método da ligadura consiste na colocação de um fio de algodão ao redor do molar facilitando assim o acúmulo local de microrganismos, com a formação de um biofilme, e consequentemente, gerando uma resposta inflamatória com destruição dos tecidos periodontais (Graves et al.⁷ 2008, Abe e Hajishengallis⁸ 2013).

Dentre as variáveis a serem estudadas, a análise da perda óssea alveolar (POA) se constitui como o principal parâmetro, uma vez que representa o desfecho da doença de maior relevância clínica. Na literatura são descritos diferentes métodos para avaliar a perda óssea alveolar, sendo eles: 1) Radiográfico, que mede a distância linear entre a junção amelo-cementaria (JAC) e a crista óssea alveolar mesial do primeiro molar inferior (Herrera et al.⁹ 2011, do Nascimento et al.¹⁰ 2013); 2) Morfométrico, que permite medir a distância linear entre a JAC e o rebordo ósseo lingual dos molares (Nociti et al.⁴ 2000, Anbinder et al.¹¹ 2006), ou a área da perda óssea; e 3) Histológico, que mensura a perda óssea interproximal entre o primeiro e

segundo molar, calculando a distância linear entre a JAC e a crista óssea (Fernandes et al.¹² 2007, Semenoff et al.¹³ 2008, Semenoff et al.¹⁴ 2008).

Em acréscimo a POA, outros parâmetros usualmente avaliados na pesquisa periodontal são: (1) Migração leucocitária; (2) Produção de óxido nítrico; (3) Produção de citocinas; (4) Formação de prostaglandinas; (5) Formação de radicais livres e (6) Atividade da enzima metaloproteinase de matriz – MMP (Herrera et al.⁹ 2011, Liao et al.¹⁵ 2014). Na literatura há uma grande variação do tempo de indução da POA, variando de 3 a 60 dias. Assim, o conhecimento da cinética destes parâmetros (variação ao longo do tempo), bem como da própria perda óssea alveolar, é de fundamental importância na pesquisa que envolve a doença periodontal, uma vez que permite um planejamento experimental mais adequado e o melhor entendimento do resultado (Abe e Hajishengallis⁸ 2013, Herrera et al.⁹ 2011, do Nascimento et al.¹⁰ 2013, Kuhr et al.¹⁶ 2004).

Em acréscimo, para se obter resultados confiáveis e que possam ser extrapolados entre estudos de um mesmo grupo ou de grupos de pesquisa diferentes, a avaliação da concordância de uma metodologia representa uma etapa crucial no estabelecimento da mesma. A concordância pode ser realizada comparando os resultados obtidos por um mesmo examinador em tempos diferentes (Repetitividade ou Concordância intra-examinador) ou entre examinadores diferentes (Reprodutibilidade ou Concordância inter-examinadores).

A concordância de Bland Altman busca descobrir se duas metodologias e/ou medidas são equivalentes e se uma poderia substituir a outra (Hirakata e Camey¹⁷ 2010), e nos últimos anos tem sido utilizado este teste estatístico em pesquisas da área médica/odontológica que buscam comparar e validar técnicas e tratamentos (EzEldeen et al.¹⁸ 2015, Sindi et al.¹⁹ 2015).

De forma interessante, embora estes métodos de avaliação da POA sejam consagrados, na atualidade há poucos relatos de estudos que estabeleçam esta concordância para os principais métodos citados de análise desta variável.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a cinética da perda óssea alveolar, a migração leucocitária e a produção de óxido nítrico nos tempos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a indução de DP por ligadura e avaliar a concordância pelo método de Bland-Altman para as principais metodologias de avaliação da perda óssea alveolar (radiográfica, morfométrica e histológica).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença periodontal

A doença periodontal (DP) é uma doença imuno-inflamatória crônica do periodonto que inicia com uma inflamação do tecido gengival conhecida como gengivite, esta evolui e periodontite afetando o ligamento periodontal e o osso alveolar (Pihlstrom et al.¹ 2005, Kinane²⁰ 2001, Bascones-Martinez et al.²¹ 2009).

Acredita-se que esta doença afeta mais de 47% dos adultos nos Estados Unidos (Eke et al.²² 2012). Em 2014 Kassebaum e colaboradores realizaram um levantamento epidemiológico baseado nos artigos publicados entre 1990 e 2010 com a finalidade de validar os dados mundiais sobre a periodontite severa, no qual foram incluídos 72 artigos que abrangeram 37 países e 291.170 pessoas com 15 anos ou mais. Ao final do estudo concluíram que Austrália e Grécia foram os países com maior prevalência (*Figura 1*), e Argentina foi o país com maior incidência. No mesmo estudo foi concluído que a incidência da doença é próxima aos 38 anos, e a prevalência começa a aumentar por volta dos 20 anos (*Figura 2*) (Kassebaum et al.²³ 2014).

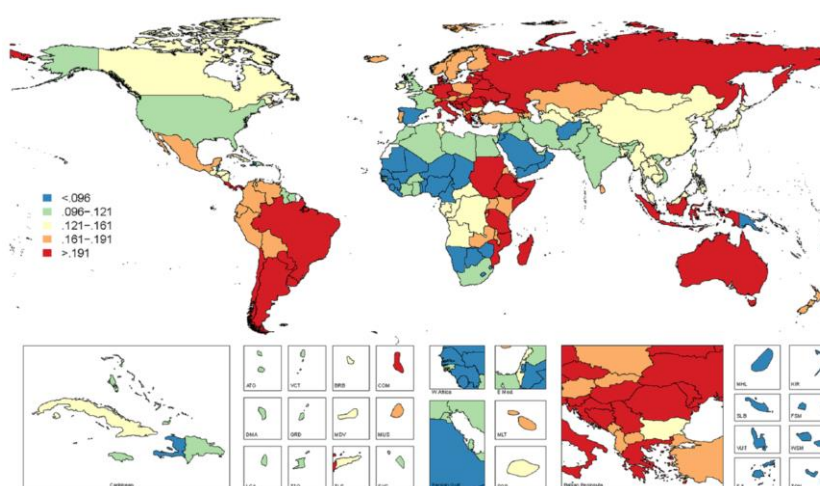


Figura 1. Prevalência (proporção) mundial de periodontite crônica severa na idade suscetível (15 anos ou mais) em 2010 (Kassebaum et al.²³ 2014).

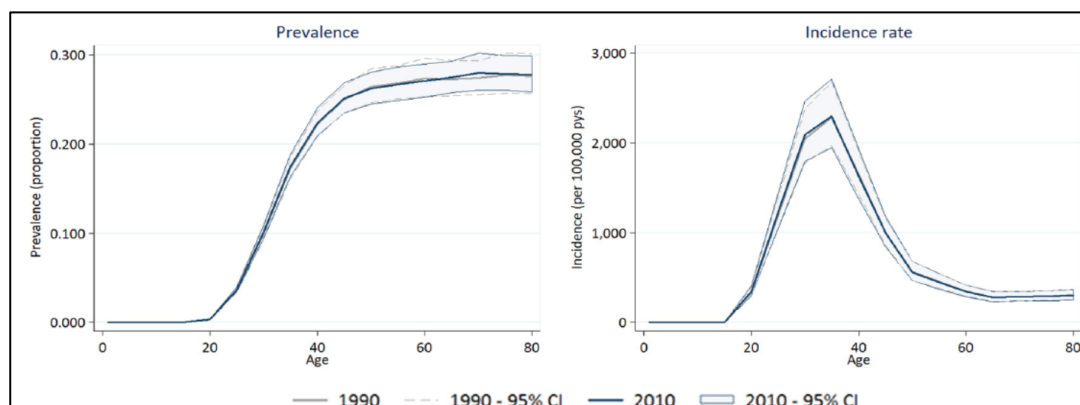


Figura 2. Prevalência (proporção) e incidência (por 100.000 pessoas/ano) da periodontite crônica severa em 1990 (linha clara) e 2010 (linha escura) com 95% de intervalo de incerteza por idade (Kassebaum et al.²³ 2014).

A doença periodontal começa com a presença de um biofilme microbiano na superfície dos dentes, que induz uma resposta inflamatória local do tecido gengival, conhecida como gengivite (Nanci e Bosshardt²⁴ 2006). Ela é caracterizada por uma transição de microrganismos Gram-positivos a Gram-negativos (Darveau²⁵ 2010).

Em decorrência da presença deste biofilme, o hospedeiro ativa uma resposta imuno-inflamatória com a migração e participação de neutrófilos, linfócitos e macrófagos (Akira et al.²⁶ 2001, ARANCIBIA et al.²⁷ 2007). Lipopolissacarídeos (LPS), presentes na parede celular bacteriana, estimulam a formação local de mediadores pro inflamatórios, tais como: prostaglandina E2 (PGE₂), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o receptor do ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANK-L) (Sorsa et al.²⁸ 1992, McCauley e Nohutcu²⁹ 2002, Di Benedetto et al.³⁰ 2013, Yucel-Lindberg e Båge³¹ 2013). As células presentes neste processo inflamatório liberam metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas responsáveis pela destruição de matriz extracelular tecidual, principalmente o colágeno. (Zaidi et al.³² 2003, Ebersole et al.³³ 2013, Kinney et al.³⁴ 2014). Em acréscimo, em decorrência de um desequilíbrio no sistema RANK-RANKL-OPG, os osteoclastos são ativados e iniciam a destruição do osso alveolar (Wei et al.³⁵ 2005, Nagasawa et al.³⁶ 2007) (Figura 3).

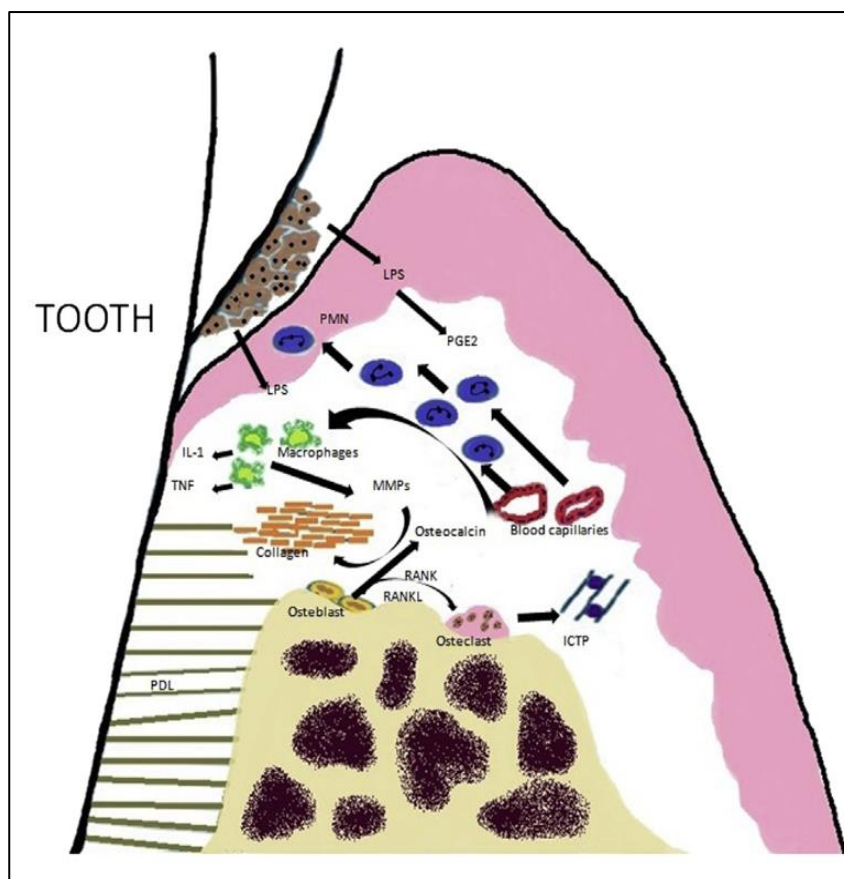


Figura 3. Patogênese da doença periodontal (Gupta et al.³⁷).

De forma interessante, Page em 1998 realizou uma pesquisa na qual demonstrou que a área total de tecido inflamado em um paciente portador de periodontite crônica pode chegar a 72 cm², o que equivale a palma de uma mão (Figura 4) (Page³⁸ 1998). Sendo assim, nos últimos anos tem sido demonstrada a relação da DP com algumas condições sistêmicas como diabetes, doença cardiovascular, obesidade, trabalho de parto prematuro, pneumonia, dentre outras (Dentino et al.³⁹ 2013). Isto se deve ao fato de que as bactérias presentes neste tecido inflamado podem penetrar na corrente sanguínea através de ulcerações do epitélio conseguindo assim, colonizar outras partes do corpo, especialmente em pacientes com imunidade comprometida (Schmidlin et al.⁴⁰ 2001, Kim e Amar⁴¹ 2006). Em acréscimo, estes patógenos periodontais também provocam reações inflamatórias locais, com repercussão sistêmica, uma vez que os mediadores inflamatórios podem contribuir para o início/agravamento das condições citadas acima (Kim e Amar⁴¹ 2006, Davé e Van Dyke⁴² 2008).

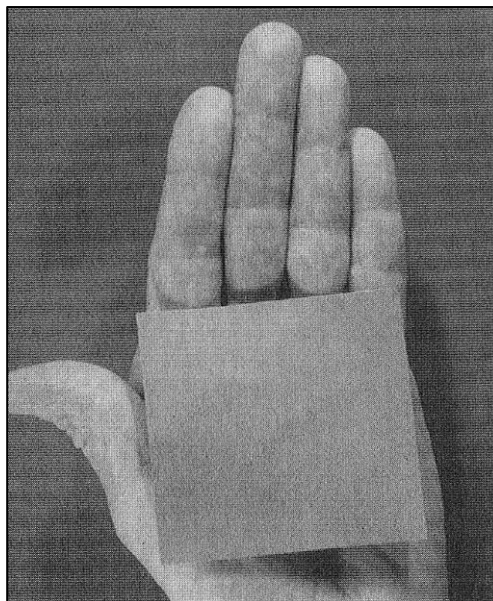


Figura 4. Área da palma da mão (72cm^2) equivalente à área da bolsa periodontal (Page³⁸ 1998).

O tratamento da DP é baseado principalmente em remover o fator causal. Assim, primeiramente é realizada uma instrução e motivação em higiene bucal, seguida pelo debridamento mecânico do biofilme supra e sub-gengival (Dentino et al.³⁹ 2013). Porém, em alguns casos a remoção mecânica não é suficiente e, como tratamento coadjuvante podem ser utilizados medicamentos moduladores da resposta inflamatória e/ou antimicrobianos de ação local ou sistêmica (Tariq et al.⁴³ 2012).

2.2. Modelos animais

O primeiro modelo animal com indução de perda óssea alveolar foi realizado no Instituto Forsyth nos Estados Unidos (Sharawy et al.⁴⁴ 1966), e atualmente há mais de 2.000 artigos na área de periodontia utilizando modelos animais (Kantarci et al.⁴⁵ 2015). Seu uso é necessário para comprovar as relações de causa e efeito, além de estabelecer a segurança e eficácia de novos compostos terapêuticos, já que eles podem mimetizar as interações que ocorrem entre a resposta imune, a microbiota e o tecido do hospedeiro (*Figura 5*) (Pihlstrom et al.¹ 2005, Hajishengallis et al.⁴⁶ 2015).

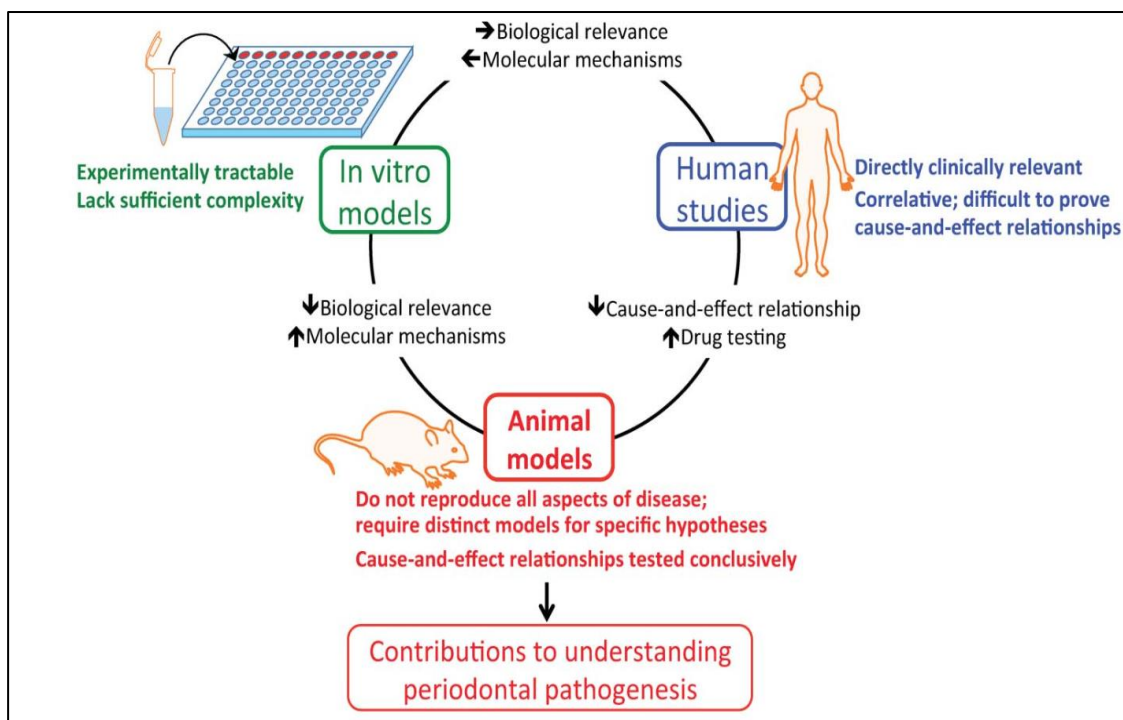


Figura 5. Importância e aporte do uso de modelos animais em pesquisa (Hajishengallis et al.⁴⁶ 2015).

A seleção de um determinado modelo animal baseia-se na sua capacidade para testar uma hipótese específica (Graves et al.⁷ 2008). Na literatura, os animais utilizados em pesquisa na área da periodontia são: macaco, cachorro, coelho, camundongo e rato. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens importantes no desenvolvimento de uma pesquisa (*Tabela 1*) (Struillou et al.³ 2010, Graves et al.⁷ 2008, Kantarci et al.⁴⁵ 2015, Oz e Puleo⁴⁷ 2011, Bright et al.⁴⁸ 2015).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos modelos animais usados em pesquisa na área da periodontia (Struillou et al.³ 2010, Graves et al.⁷ 2008, Kantarci et al.⁴⁵ 2015, Oz e Puleo⁴⁷ 2011, Bright et al.⁴⁸ 2015).

Modelo animal	Vantagens	Desvantagens
Macaco	- Estrutura da cavidade oral similar aos humanos. - Presença natural de placa bacteriana, cálculo dental e patógenos periodontais.	- Requisitos de criação especiais. - Propensos a doenças infecciosas, como tuberculose. - Custo elevado.
Cachorro	- Permite estudar a ocorrência natural de gengivite e periodontite. - Podem ser usados em pesquisas que envolvem procedimentos cirúrgicos em periodontia.	- Os regulamentos de cuidados deles inclui companhia diária, exercício, espaço e manutenção maiores.
Coelho	- Fisiologia e patologia da anatomia periodontal similar aos humanos.	- Requisitos de cuidado especiais. - Precisa de ligadura e inoculação de periodontopatógenos para induzir a perda óssea alveolar
Roedores	- Permite avaliar respostas microbianas. - Podem ser modificados geneticamente. - São de fácil manejo. - Baixo custo	- Em condições "naturais" são resistentes a periodontite.

O rato é o roedor mais utilizado para estudar a patogênese da DP. A anatomia da região do primeiro molar deste é similar à observada em seres humanos (Struillou et al.³ 2010). Em acréscimo, a patogênese da DP também se assemelha a observada em humanos, uma vez que a mesma inicia-se com a formação de um biofilme local com a geração de uma resposta inflamatória, culminando na destruição dos tecidos de proteção e sustentação do dente (Aguirre et al.² 2012). Outra característica importante é que este modelo permite a avaliação de condições sistêmicas relacionadas com a progressão da DP ou vice-versa (Graves et al.⁷ 2008). Em relação às espécies, as mais utilizadas são Wistar e Sprague-Dawley (Struillou et al.³ 2010, Oz e Puleo⁴⁷ 2011, Bright et al.⁴⁸ 2015).

2.3. Indução da perda óssea alveolar em ratos

Em ratos, a perda óssea alveolar é usualmente induzida por: (1) inoculação de microrganismos periodontopatógenos; (2) aplicação de LPS no tecido gengival ou (3) mediante a inserção de um fio de algodão na região subgengival de molares (ligadura) (Abe e Hajishengallis⁸ 2013, Dumitrescu et al.⁴⁹ 2004, Zhang et al.⁵⁰ 2014).

A indução com inoculação de periodontopatógenos consiste em uma infecção local específica com microrganismos relacionados com a DP. Sabe-se que a *Porphyromonas gingivalis* é capaz de invadir células periodontais e alterar a hemostasia de osteoblastos e osteoclastos, ocasionando assim, a perda óssea alveolar (Zhang et al.⁵⁰ 2014).

A injeção intragengival de LPS é aplicada usualmente na região do segundo molar e resulta num processo inflamatório local, com destruição dos tecidos periodontais, incluindo a perda óssea alveolar (Dumitrescu et al.⁵¹ 2004).

O modelo de ligadura consiste na inserção de um fio de algodão ao redor da superfície cervical dos molares, com a finalidade de promover um acúmulo microbiano e, assim, desencadear uma resposta inflamatória com consequente reabsorção óssea. Este modelo representa o que ocorre nos humanos, uma vez que é dependente de uma colonização bacteriana (Graves et al.⁷ 2008, Abe e Hajishengallis⁸ 2013).

2.4. Avaliação da perda óssea alveolar

Conhecer a condição do osso alveolar é essencial para o diagnóstico, prognóstico e plano de tratamento (de Faria Vasconcelos et al.⁵² 2012). Existem diferentes métodos para avaliar a perda óssea alveolar (POA) em modelo animal, sendo os mais reportados na literatura o método radiográfico, morfométrico e o histológico.

A avaliação da POA mediante radiografia mede a distância linear entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar na região mesial do primeiro molar inferior (Herrera et al.⁹ 2011, do Nascimento et al.¹⁰ 2013, Hammer et al.⁵³ 2005). As radiografias 2D como método de análise são empregadas em decorrência de seu baixo custo e fácil realização. Porém, como desvantagem, pode apresentar sobreposição de estruturas anatômicas, gerando, muitas vezes, uma dificuldade em sua padronização e análise (de Faria Vasconcelos et al.⁵² 2012).

A análise morfométrica permite quantificar a perda óssea de duas maneiras: (A) Linear: distância entre a JAC e o rebordo ósseo alveolar na superfície lingual, tendo como referência os longos eixos das raízes dos molares inferiores (Nociti et al.⁴ 2000, Anbinder et al.¹¹ 2006) e (B) Área: Perda óssea delimitada pela JAC e o rebordo ósseo alveolar na região de molares inferiores (de Souza et al.⁵⁴ 2010).

A mensuração histológica permite a avaliação da POA também, por meio de uma medida linear na região interproximal entre o primeiro e segundo molar inferior (distância entre a JAC e a crista óssea) (Semenoff et al.¹⁴ 2008, Branco-de-Almeida et al.⁵⁵ 2012).

2.5. Concordância Bland Altman

A concordância busca descobrir se duas metodologias e/ou medidas são equivalentes e se uma poderia substituir a outra (Hirakata e Camey¹⁷ 2010). Em 1983 foi proposta uma metodologia alternativa por Bland e Altman para avaliar a concordância, pois o coeficiente de correlação utilizado até esse momento só avalia a associação de duas medidas. O teste Bland Altman resulta em um gráfico de dispersão, no qual é possível visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), além de outliers e tendências (Altman e Bland⁵⁶ 1983).

Em odontologia, o teste de Bland Altman tem sido utilizado nas áreas de periodontia, ortodontia e endodontia. Santos e colaboradores em 2008, realizaram um estudo para comparar a eficácia de diferentes ultrassons (Santos et al.⁵⁷ 2008). Lippold e colaboradores em 2015, compararam a análise de modelos de ortodontia pelas técnicas manual e digital (Lippold et al.⁵⁸ 2015). Tanomaru-Filho e colaboradores em 2015 compararam a radiografia periapical e a tomografia cone-beam na mensuração de lesões apicais (Tanomaru et al.⁵⁹ 2015). Em todos os estudos mencionados anteriormente foi utilizado o teste Bland Altman.

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a cinética da perda óssea alveolar, a migração leucocitária e a produção de óxido nítrico nos tempos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a colocação da ligadura para indução da POA em ratos, e avaliar a concordância de Bland-Altman para as principais metodologias de avaliação da perda óssea alveolar (radiográfica, morfométrica e histológica).

3.2. Específico

- Estabelecer a concordância entre as metodologias (radiográfica, morfométrica e histológica) usadas para medir a perda óssea alveolar.
- Estabelecer o tempo mínimo de aparição de uma perda óssea alveolar significativa nas diferentes metodologias de análise (radiográfica, morfométrica e histológica).
- Determinar a cinética de migração leucocitária.
- Determinar a cinética de produção de óxido nítrico
- Determinar a concordância (intra e inter-examinador) dos resultados obtidos na mensuração da perda óssea alveolar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e considerações éticas

Foi realizado o cálculo amostral com o Software G*Power 3.1 (Faul et al.⁶⁰ 2007), assumindo uma diferença como significativa maior do que 1.5 do desvio padrão no parâmetro de POA e considerando os erros Tipo I (α) e Tipo II (β) de 5% e 20%, respectivamente. Neste sentido, sessenta ratos Wistar machos, entre 250g e 300g, provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) foram divididos em 6 grupos experimentais ($n = 10$ animais/grupo) conforme descrição a seguir. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do uso de Animal da UEPG (Processo CEUA-014/2013) (*Anexo A*). A manipulação dos animais foi seguindo as diretrizes do CONCEA e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008.

4.2. Divisão dos grupos:

Os animais foram divididos de forma randomizada em 6 grupos experimentais com 10 ratos em cada (*Tabela 2*).

Tabela 2. Divisão dos grupos

Grupo	Tratamento	Sacrifício
G0	Sem ligadura	Dia 0
G3	Com ligadura	Dia 3 após a ligadura
G7	Com ligadura	Dia 7 após a ligadura
G15	Com ligadura	Dia 15 após a ligadura
G30	Com ligadura	Dia 30 após a ligadura
G60	Com ligadura	Dia 60 após a ligadura

4.3. Procedimento cirúrgico:

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal - IP (Ketamina 10%, 90mg/kg e Xilasina 2%, 10mg/kg). Após isto, foi realizado o procedimento cirúrgico de ligadura inserindo um fio de algodão na região cervical dos primeiros molares inferiores (*Figura 6*). Após 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica, e as hemimandíbulas foram removidas, sendo a direita para análise radiográfica e morfométrica; e a esquerda para análise histológica. Além disso foi coletado o tecido gengival adjacente a ligadura do primeiro molar inferior para as análises de migração leucocitária e dosagem de nitrito.

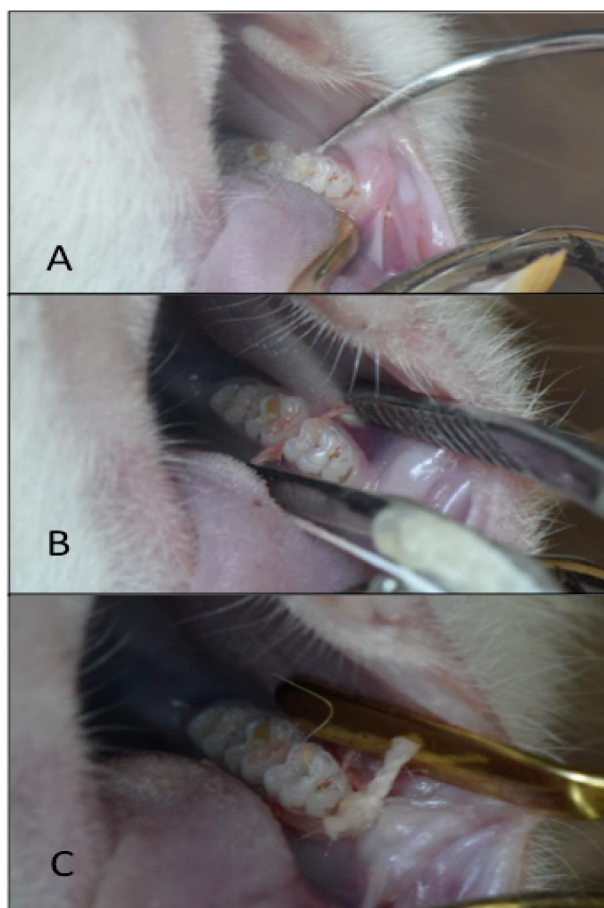


Figura 6. Procedimento cirúrgico de ligadura: (A) Primeiro molar inferior; (B) Inserção do fio de algodão na superfície interproximal entre o primeiro e o segundo molar; (C) Método de ligadura finalizado

4.4. Análise radiográfica

Foi realizada radiografia convencional das hemimandíbulas com filme D Ultra-speed , padronizando a posição da hemimandíbula com a linha oclusal dos molares paralela ao filme, distância (área focal – mandíbula) de 30 cm e o tempo de exposição de 0,63 segundos. As imagens foram digitalizadas e a distância linear entre a JAC e a crista óssea alveolar mesial do primeiro molar (mm) foi mensurada no software Image J 1.48 (*Figura 7*).

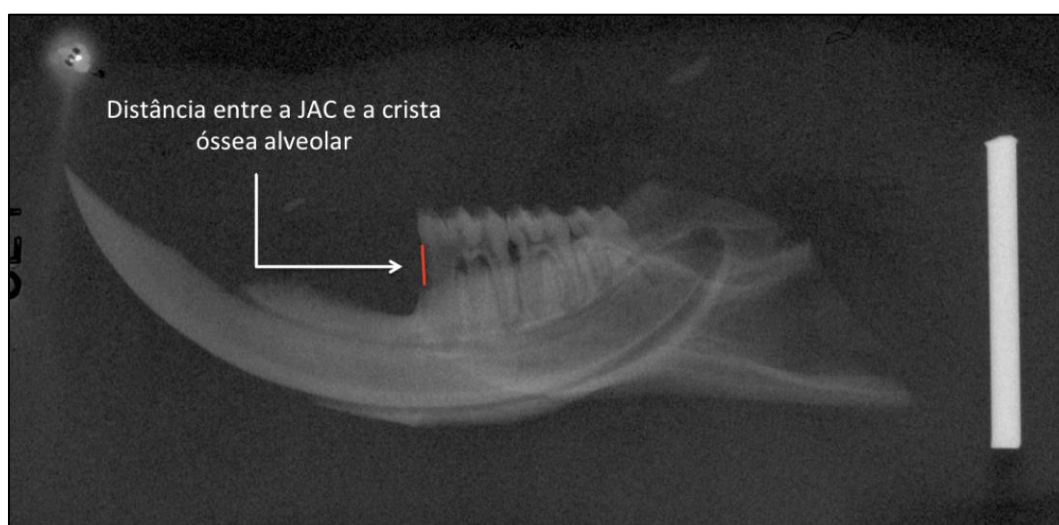


Figura 7. Análise radiográfica: Distância (mm) entre a JAC e a crista óssea alveolar mesial do primeiro molar inferior.

4.5. Análise morfométrica

As hemimandíbulas foram fervidas por 30 minutos e imersas overnight em água oxigenada (vol. 10). Após este procedimento, as hemimandíbulas foram coradas com azul de metileno 1% para demarcação da JAC. Cada hemimandíbula foi fotografada com o uso de uma lupa estereoscópica. As mensurações foram feitas pela face lingual no software Image J 1.48.

Para cada hemimandíbula foi medida: 1) A distância linear (mm) entre a JAC e o reborde ósseo alveolar, tendo como referência os longos eixos das raízes do primeiro molar inferior, sendo assim um total de três mensurações que correspondem ao número de raízes deste dente, e foi obtida a média destas

medidas. 2) A distância linear (mm) entre a JAC e o reborde ósseo alveolar, tendo como referência os longos eixos das raízes dos três molares inferiores, sendo assim um total de sete mensurações que correspondem ao número de raízes destes dentes, e foi obtida a média destas medidas. 4) A área (mm^2) da perda óssea compreendida entre a JAC e o reborde ósseo alveolar do primeiro molar inferior. 5) A área (mm^2) da perda óssea compreendida entre a JAC e o reborde ósseo alveolar dos três molares inferiores (*Figura 8*).

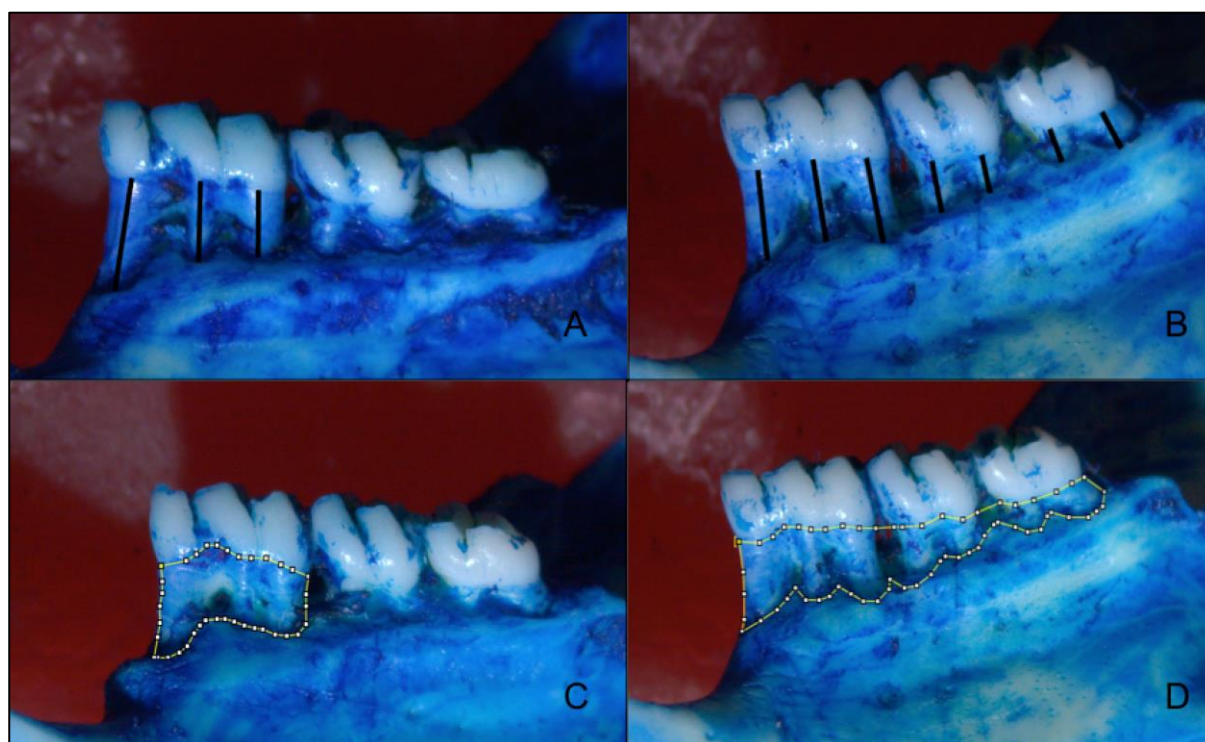


Figura 8. Análise morfométrica: (A) Morfometria linear do primeiro molar inferior: Distância (mm) entre a JAC e o rebordo ósseo; (B) Morfometria linear dos três molares inferiores: Distância (mm) entre a JAC e o rebordo ósseo; (C) Morfometria área do primeiro molar inferior: Área (mm^2) da perda óssea entre a JAC e o rebordo ósseo; (D) Morfometria área dos três molares inferiores: Área (mm^2) da perda óssea entre a JAC e o rebordo ósseo.

4.6. Análise histológica

As hemimandíbulas foram imersas em formalina 10%, descalcificadas com EDTA 4%, processadas e coradas com Hematoxilina Eosina (HE). As lâminas obtidas foram examinadas no microscópio Olympus BX41. Para cada amostra foi

medida no software Image J a distância linear (mm) entre a JAC e a crista óssea alveolar na região interproximal entre o primeiro e segundo molar (*Figura 9*).

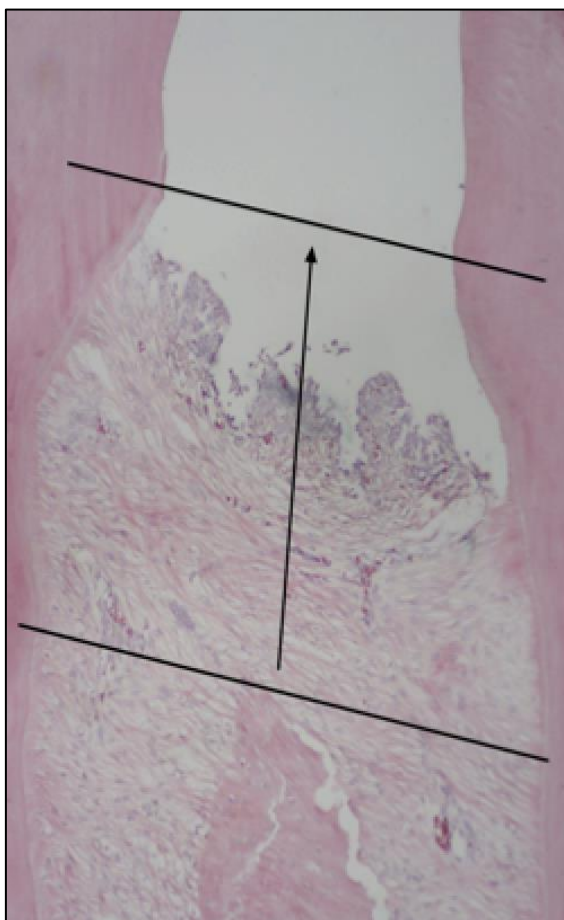


Figura 9. Análise histológica: Distância linear entre a JAC e a crista óssea interproximal do primeiro e segundo molar inferior (mm).

4.7. Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase

A avaliação da cinética do infiltrado leucocitário (neutrófilo) no tecido gengival foi realizada pela análise da atividade enzimática da mieloperoxidase (Queiroz-Junior et al.⁶¹ 2013). Trezentos microlitros de uma solução contendo tampão fosfato de sódio 80mM e 0,5% de hexadeciltrimetilamônio foram adicionados ao tecido gengival previamente coletado e este homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm a 4°C por 4 minutos. Em 30 µl do sobrenadante foram adicionados 200µl de uma solução contendo 100µl de tampão fosfato de sódio 80mM, 85µl de tampão fosfato de sódio 22mM e 15µl de peróxido de hidrogênio 0,017%. Em seguida, adicionaram-se 20µl de uma solução contendo tetrametilbenzidina 18,4mM dissolvida em

dimetilformamida 8%. A placa foi incubada por 3 minutos a 37°C e após a adição de 30µl de acetato de sódio 1,46mM, realizou-se a leitura da absorbância de cada amostra em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 620nm.

4.8. Quantificação do Nitrito

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro à infecção, as fontes potenciais de NO no periodonto são células inflamatórias. Sob condições fisiológicas, o NO é instável e é rapidamente oxidado a uma mistura de nitrito e nitrato (Herrera et al.⁹ 2011). A avaliação da cinética do óxido nítrico foi realizada mediante a quantificação de nitrito no tecido gengival. Trezentos microlitros de uma solução contendo tampão fosfato de sódio 80mM e 0,5% de hexadeciltrimetilamônio foram adicionados ao tecido gengival previamente coletado e este homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm a 4°C por 4 minutos. Em 50 µl do sobrenadante foram adicionados 50 µl de solução Sulfanilamide e 50 µl de solução de Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED). Realizou-se a leitura da absorbância de cada amostra em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 550nm.

4.9. Determinação da Concordância de Bland-Altman

A concordância de Bland-Altman foi realizada para o grupo 15 dias, comparando os resultados obtidos por um mesmo examinador em tempos diferentes (Repetitividade ou Concordância intra-examinador) e entre examinadores diferentes (Reprodutibilidade ou Concordância inter-examinadores).

- Intra-examinador (Repetitividade): O mesmo examinador realizou as mensurações duas vezes para cada metodologia com um intervalo de duas semanas.
- Inter-examinador (Reprodutibilidade): Um examinador diferente previamente treinado realizou as mensurações para cada metodologia.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados com ANOVA e Teste Tukey para determinar a diferença estatística entre os tempos experimentais; o teste Bland Altman para estabelecer a concordância das metodologias de quantificação da POA e o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi de 5% para todos os testes.

5. RESULTADOS

5.1. Concordância de Bland Altman das metodologias (intra e inter-examinador)

As análises morfométricas (linear e da área) e histológica demonstraram uma adequada concordância tanto na avaliação de repetitividade (intra-examinador) como na de reprodutibilidade (inter-examinador). No entanto para a metodologia radiográfica observou-se diferença significativa intra e inter-examinador entre as mensurações (*Figura 11-12*).

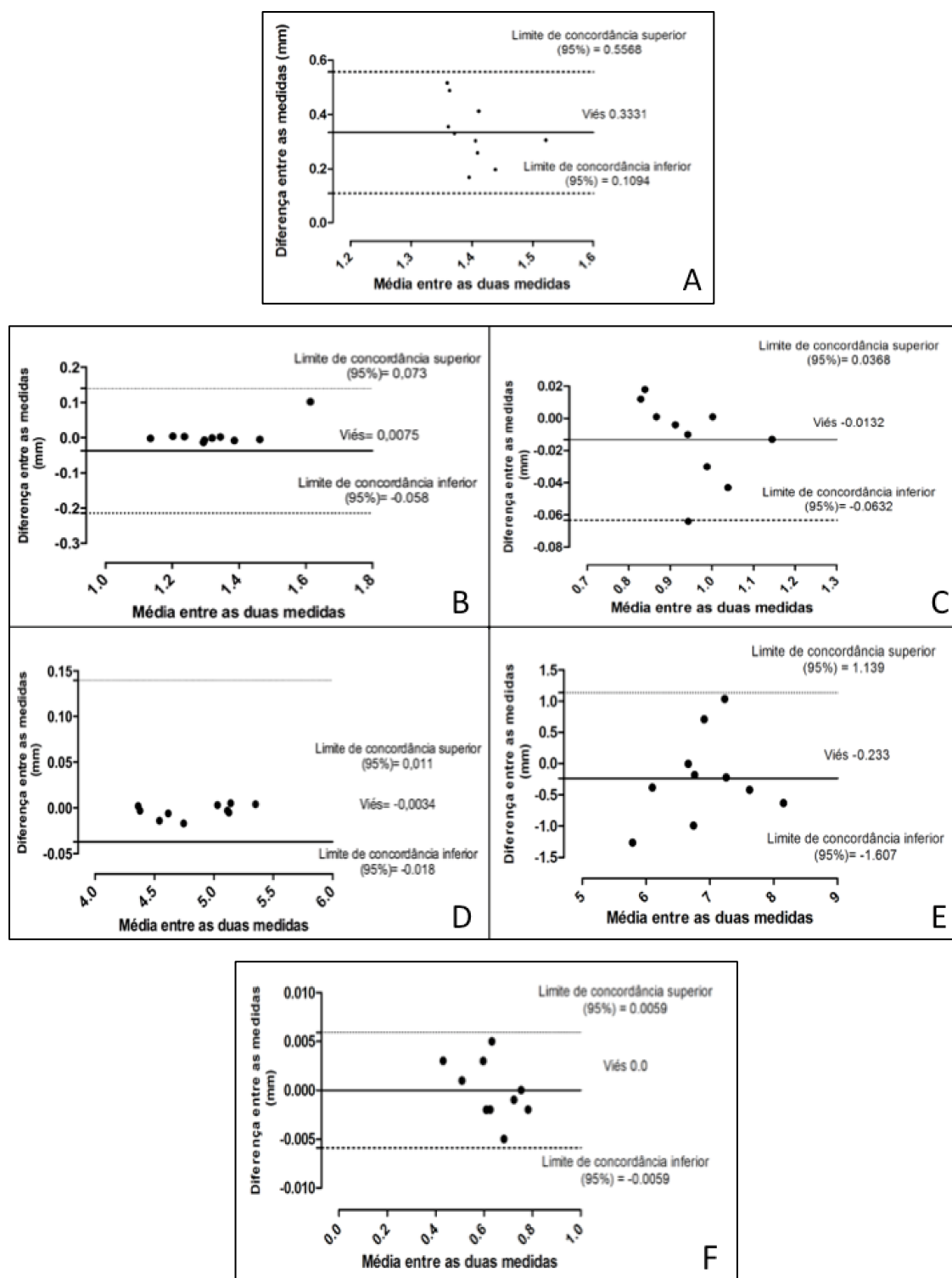


Figura 10. Repetitividade: (A) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise radiográfica); (B) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear do primeiro molar); (C) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear dos três molares); (D) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear da área do primeiro molar); (E) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica da área dos três molares); (F) Teste de concordância intra-examinador de Bland-Altman (Análise histológica).

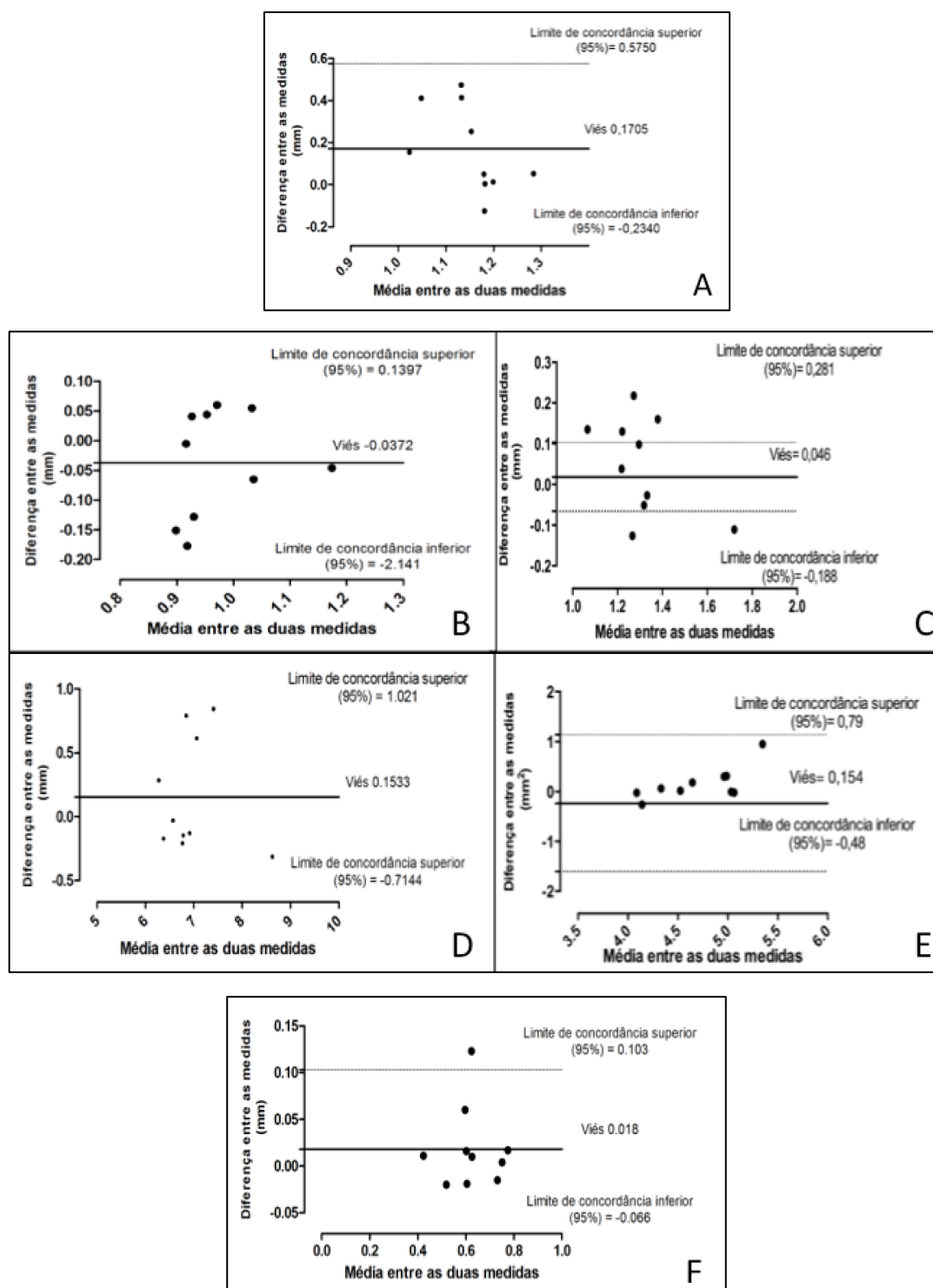


Figura 11. Reprodutibilidade: (A) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise radiográfica); (B) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear do primeiro molar); (C) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear dos três molares); (D) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica linear da área do primeiro molar); (E) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise morfométrica da área dos três molares); (F) Teste de concordância inter-examinador de Bland-Altman (Análise histológica).

5.2. Correlação entre as metodologias

Os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre as metodologias radiográfica, morfométrica linear/área e histológica revelaram uma alta correlação positiva entre as metodologias.

Tabela 3. Correlação de Pearson entre as metodologias de mensuração da POA: Todas apresentaram uma alta correlação ($r>0,90$) ($p<0,05$).

	Radiográfica	Morfométrica linear 1 molar	Morfométrica linear 3 molares	Morfométrica área 1 molar	Morfométrica área 3 molares	Histológica
Radiográfica		0,977	0,963	0,907	0,985	0,956
Morfométrica linear 1 molar	0,977		0,995	0,972	0,98	0,916
Morfométrica linear 3 molares	0,963	0,995		0,984	0,961	0,902
Morfométrica área 1 molar	0,907	0,972	0,984		0,927	0,949
Morfométrica área 3 molares	0,985	0,98	0,961	0,927		0,959
Histológica	0,956	0,916	0,902	0,949	0,959	

5.3. Cinética da perda óssea alveolar

Na metodologia radiográfica foi observada perda óssea alveolar estatisticamente significativa após o terceiro dia, aumentando progressivamente, com diferença estatística, nos demais tempos analisados.

Na análise morfométrica linear do primeiro molar, e dos três molares, a perda óssea foi significativa no terceiro dia, e a partir do décimo quinto, houve uma estabilização desta reabsorção.

Na análise morfométrica da área do primeiro molar, e dos três molares, a perda óssea foi significativa a partir do sétimo dia, e estabilizou-se a partir do décimo quinto dia.

E, na metodologia histológica, a perda óssea foi significativa após o sétimo dia, e a partir do trigésimo dia estabilizou (*Figura 13*).

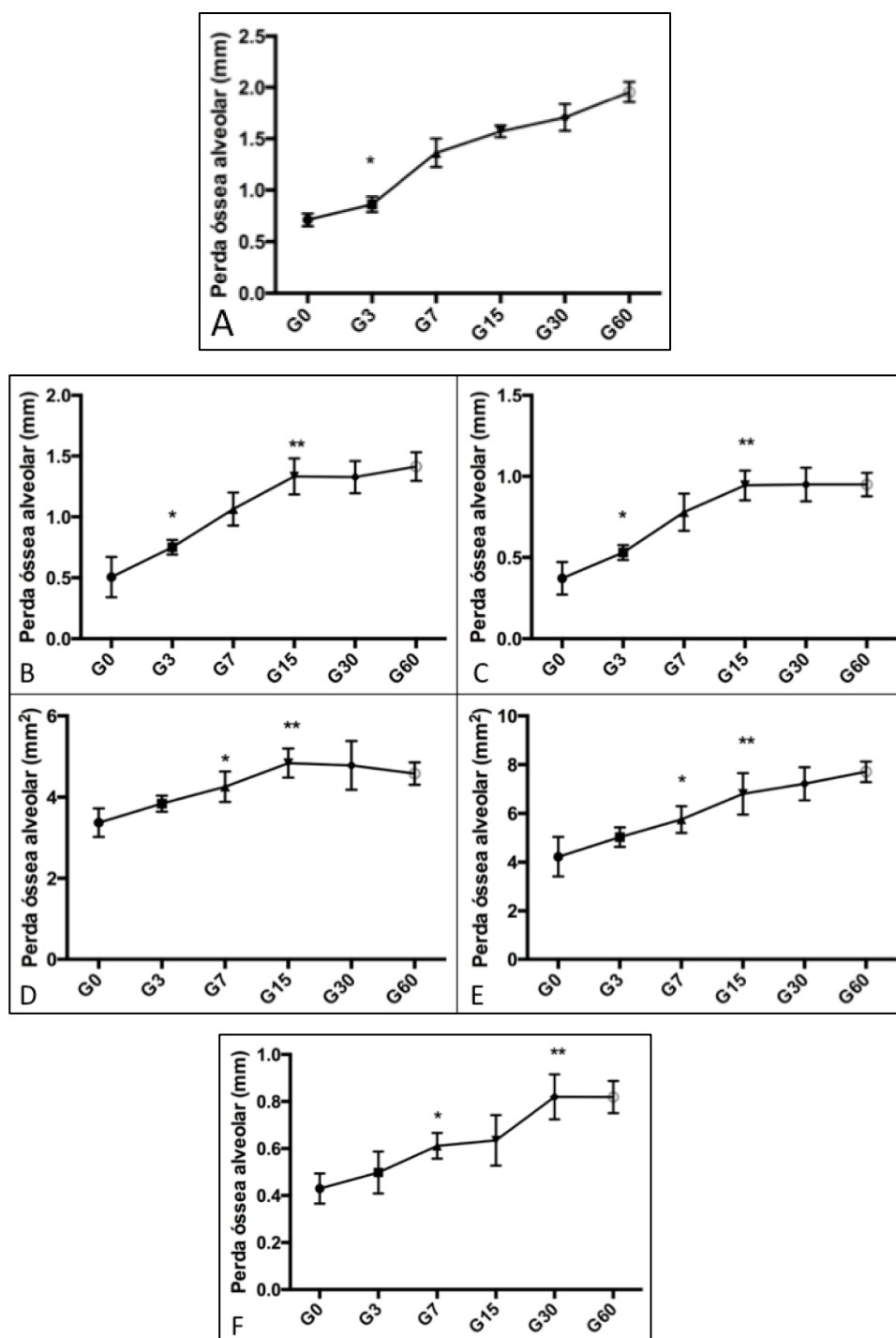


Figura 12. Cinética da perda óssea alveolar para as diferentes análises: (A) Análise radiográfica; (B) Análise morfométrica linear do primeiro molar; (C) Análise morfométrica linear dos três molares; (D) Análise morfométrica área do primeiro molar; (E) Análise morfométrica área dos três molares; (F) Análise histológico.

(*) corresponde ao primeiro tempo com diferença estatisticamente significativa da POA em relação ao G0 (ANOVA – Tukey, $p < 0,05$).

(**) corresponde ao tempo em que ocorre a estabilização da POA (ANOVA – Tukey, $p > 0,05$).

5.4. Cinética da resposta inflamatória

Foi observado um aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática da mieloperoxidase até o sétimo dia, representando este o pico de maior atividade. Após este tempo experimental houve uma diminuição da atividade até o trigésimo dia, e a partir deste uma estabilização do processo. Na quantificação do óxido nítrico foi observado um aumento estatisticamente significativo no sétimo dia, e o décimo quinto dia foi o pico de maior atividade. Após este tempo experimental houve uma diminuição da atividade até o trigésimo dia, e a partir deste uma estabilização do processo (*Figura 14*).

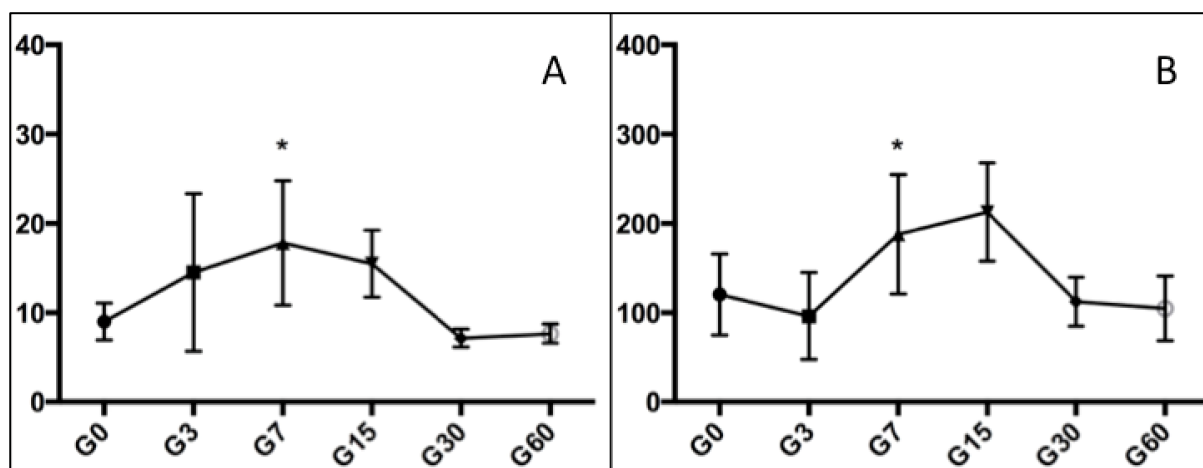


Figura 13. (A) Medida da atividade enzimática da Mieloperoxidase; (B) Medida da quantificação de óxido nítrico.

(*) corresponde ao primeiro tempo com diferença estatisticamente significativa em relação ao G0 (ANOVA – Tukey, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Quando da impossibilidade de uma metodologia alternativa, o uso criterioso de modelos animais na pesquisa representa uma importante etapa no entendimento da etiologia, patogênese e terapêutica de diferentes doenças, incluindo a doença periodontal (DP) (Kantarci et al.⁴⁵ 2015). Neste sentido, cada vez é mais frequente o desenvolvimento de trabalhos relacionados a DP que envolvem animais. Entre 2012 e 2015 foram publicados no Pubmed mais de 126 artigos, que estudaram aspectos relacionados à DP em modelos animais (ratos), sendo a metodologia de indução por meio da inserção de um fio de algodão (ligadura) na região cervical de molares, o método mais utilizado pelos pesquisadores. A DP induzida por ligadura está associada ao acúmulo bacteriano, sendo as bactérias Gram-negativas envolvidas no início e progressão desta doença (Oz e Puleo⁴⁷ 2011).

São vários os parâmetros usados para avaliar a progressão da DP, com destaque a perda óssea alveolar (POA). Embora a descrição de indução da DP pela técnica de ligadura seja descrita desde o final da década de 70, de forma interessante, a literatura é escassa em trabalhos que busquem a caracterização de suas variáveis, dificultando assim, um planejamento metodológico adequado. Em acréscimo, o estabelecimento da concordância de uma metodologia (concordância intra e inter-examinador) é de fundamental importância na ciência, uma vez que permite a extrapolação dos dados entre estudos. Além disso permite visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), além de possíveis outliers e tendências (Altman e Bland⁵⁶ 1983).

Inicialmente este estudo avaliou a POA mediante a metodologia radiográfica. Como resultado, a POA significativa apareceu no terceiro dia, sendo observado um aumento significativo em todos os demais tempos avaliados. Em relação à concordância, de forma importante, esta metodologia não foi repetitiva (concordância intra-examinador) e nem reprodutiva (concordância inter-examinadores). Sabe-se que a análise radiográfica pode ter algumas limitações em comparação a outras análises, como a sobreposição de imagens, o que dificulta o estabelecimento correto do ponto a ser demarcado (Misch et al.⁶² 2006). A não

observação da concordância desta análise faz difícil a calibração dos examinadores e a extrapolação de dados entre grupos de pesquisa e estudos.

Em relação a metodologia morfométrica, no presente estudo, a POA linear significativa foi detectada já no terceiro dia, enquanto na análise da área, a POA foi significativa somente no sétimo dia. E a avaliação de concordância, demonstrou que ambas as análises morfométricas (linear e área) apresentaram uma ótima concordância intra e inter-examinador, o que facilita a calibração dos examinadores e a extrapolação de dados.

Estudos prévios demonstram que a análise morfométrica é uma metodologia apropriada para avaliar a POA, porque permite quantificar e medir a distância entre a junção amelocementária (JAC) e o rebordo ósseo de forma simples e de baixo custo. Em acréscimo, apresenta uma boa correlação entre as duas formas de análise (linear e área), sendo na mandíbula a região lingual a mais sensível para avaliar a POA (Bezerra et al.⁶ 2008, Anbinder et al.¹¹ 2006, de Souza et al.⁵⁴ 2010, Verzeletti et al.⁶³ 2007).

Kuhr e colaboradores (2004) afirmaram que após 15 dias pode ser detectada a perda óssea com a metodologia morfométrica. Outros estudos que também utilizaram esta metodologia, induzem a DP por 30 ou 60 dias (Aguirre et al.² 2012, Fernandes et al.¹² 2007, Kuhr et al.¹⁶ 2004, de Souza et al.⁵⁴ 2010).

Fernandes e colaboradores (2007) afirmaram que tanto o método morfométrico como o histológico são capazes e sensíveis em detectar diferenças na perda óssea. Porém, o método histológico pode ter algumas desvantagens se não for realizado corretamente, pois podem ocorrer erros durante o processamento histológico pela dificuldade de realizá-lo, além de requerer tempos mais longos que as outras análises, e um custo um mais elevado em comparação ao método morfométrico (Fernandes et al.¹² 2007).

No presente estudo, no método histológico a perda óssea linear foi significativa a partir do sétimo dia. E observou-se uma concordância intra e inter-examinador. Susin e Rösing (2003) analisaram mediante histologia a perda óssea linear em ratos

Wistar, mensurando a distância entre a JAC e a porção mais apical da crista óssea interproximal entre o primeiro e o segundo molar. Os tempos reportados na literatura de avaliação de POA por histologia variam de 15 a 60 dias (Semenoff et al.¹⁴ 2008, Kim e Amar⁴¹ 2006, Susin e Rosing⁶⁴ 2003, Castro et al.⁶⁵ 2015).

A medida da atividade enzimática da mieloperoxidase é considerada um marcador de migração de neutrófilos em um local inflamado (Jacob e Nath⁶⁶ 2013). No estudo atual, observou-se um aumento significativo da MPO até o sétimo dia (pico de concentração), e após este, uma diminuição gradativa, atingindo basicamente os níveis basais (equiparáveis ao tempo 0) no trigésimo dia. Baseado neste resultado, para estudos que possuem a MPO como principal variável do estudo (Ex. avaliação de fármacos com potencial de atuar na migração leucocitária) sugere-se um desenho experimental com 7 dias de indução, uma vez que com este tempo já há uma POA significativa, independente da metodologia escolhida de sua análise, e coincide com o pico de atividade deste processo de migração. Na realização de tempos inferiores ou superiores de indução ocorre a possibilidade de não observação de diferença significativa entre o grupo sham e controle, inviabilizando assim a sua análise.

Gomes e colaboradores induziram POA em ratos com ligadura, e observaram um aumento significativo da atividade da MPO após sete dias da indução da doença, eles atribuíram esta resposta ao fato de que a MPO é uma das enzimas liberadas principalmente por neutrófilos, que representam a primeira linha de defesa contra o biofilme bacteriano (Gomes et al.⁶⁷ 2009). Queiroz e colaboradores em um estudo com ratos concluíram que a MPO é um bom marcador inflamatório em estados crônicos da DP, e confirmaram a associação da alta concentração da MPO em tecidos inflamados (Queiroz-Junior et al.⁶⁸ 2009).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que também está presente na resposta inflamatória do hospedeiro quando da presença de uma infecção bacteriana (Herrera et al.⁹ 2011). No presente estudo, o primeiro tempo em que houve um aumento significativo foi com 7 dias, alcançando o seu pico de concentração no tecido gengival no décimo quinto dia. Após este tempo, observou-se uma diminuição gradativa de sua concentração, alcançando níveis basais a partir do trigésimo dia.

Contrapondo com o achado da MPO, quando a principal variável de análise é representada pelo NO, os resultados demonstram que o tempo sugerido para os estudos é de quinze dias, coincidindo desta forma com o pico de concentração do NO. Especificamente em DP, estudos *in vivo* e clínicos tem demonstrado maior expressão de NO em tecidos com doença periodontal em relação a tecidos saudáveis (Lappin et al.⁶⁹ 2000, Batista et al.⁷⁰ 2002, Skaleric et al.⁷¹ 2006).

Analisando os resultados gerais do presente estudo, observa-se que o conhecimento da cinética da POA, migração leucocitária, produção de NO, bem como das demais variáveis, é de extrema importância para facilitar o planejamento de estudos futuros que envolvam a DP induzida por ligadura em ratos, além de permitir um melhor entendimento de resultados obtidos de pesquisas já realizadas.

Em acréscimo, a realização de testes estatísticos que avaliem a concordância (repetitividade e reprodutibilidade) de uma metodologia permitem aos pesquisadores a utilização de métodos confiáveis, gerando a possibilidade de extrapolação de resultados entre grupos de pesquisa diferentes, facilitando assim, um maior conhecimento sobre um determinado assunto, no caso deste projeto a POA.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que as análises: radiográfica e morfométrica linear apresentam uma POA significativa já no terceiro dia após a indução da POA. Nas análises: morfométrica da área e histológica a POA significativa ocorre somente após o sétimo dia da indução da POA. O pico de atividade da MPO é após sete dias da indução da doença, enquanto que para o NO, este pico ocorre no décimo quinto dia.

Em acréscimo foi observada uma concordância de Bland Altman intra e inter-examinador para as metodologias morfométricas e histológicas. Porém a metodologia radiográfica não apresentou concordância intra nem inter-examinador.

8. REFERÊNCIAS

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
2. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel J, Xia X, Williams A, et al. Enhanced alveolar bone loss in a model of non-invasive periodontitis in rice rats. *Oral Diseases*. 2012;18(5):459-68.
3. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *The Open Dentistry Journal*. 2010;4:37-47.
4. Nociti FH, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MAN, Tramontina VA, Barros SP, et al. The Influence of Nicotine on the Bone Loss Rate in Ligature-Induced Periodontitis. A Histometric Study in Rats. *Journal of periodontology*. 2000; 2000/09/01;71(9):1460-4.
5. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *Journal of periodontal research*. 2003;38(3):351-3.
6. Bezerra JP, da Silva LRF, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of High Doses of Caffeine Increases Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of periodontology*. 2008; 2008/12/01;79(12):2356-60.
7. Graves DT, Fine D, Teng Y-TA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(2):89-105.
8. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*. 2013;394(1-2):49-54.

9. Herrera BS, Martins-Porto R, Maia-Dantas A, Campi P, Spolidorio LC, Costa SKP, et al. iNOS-Derived Nitric Oxide Stimulates Osteoclast Activity and Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of periodontology*. 2011; 2011/11/01;82(11):1608-15.

10. do Nascimento CM, Cassol T, da Silva FS, Bonfleur ML, Nassar CA, Nassar PO. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2013;6:365-70.

11. Anbinder AL, Prado MdA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, Rocha RFd. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Brazilian Dental Journal*. 2006;17:201-7.

12. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian oral research*. 2007; Jul-Sep;21(3):216-21.

13. Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008; Jul-Aug;16(4):251-6.

14. Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Bosco ÁF, Nagata MJH, Garcia VG, Biasoli ER. HISTOMETRIC ANALYSIS OF LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS IN RATS: A COMPARISON OF HISTOLOGICAL SECTION PLANES. *Journal of Applied Oral Science*. 2008;16(4):251-6.

15. Liao C-H, Fei W, Shen Z-H, Yin M-P, Lu C. Expression and distribution of TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014; 5//;7(5):412-6.

16. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. 2004;39(2):101-6.
17. Hirakata VN, Camey SA. Análise de Concordância entre Métodos de Bland-Altman2010.
18. EzEldeen M, Van Gorp G, Van Dessel J, Vandermeulen D, Jacobs R. 3-dimensional analysis of regenerative endodontic treatment outcome. *Journal of endodontics*. 2015; Mar;41(3):317-24.
19. Sindi KH, Bubb NL, Gutteridge DL, Evans JA. In vitro enamel thickness measurements with ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*. 2015; Jan;41(1):301-8.
20. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2001;25(1):8-20.
21. Bascones-Martinez A, Munoz-Corcuera M, Noronha S, Mota P, Bascones-Ilundain C, Campo-Trapero J. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; Dec;14(12):e680-5.
22. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, Cdc Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck GDRP. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012; Oct;91(10):914-20.
23. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *J Dent Res*. 2014; November 1, 2014;93(11):1045-53.
24. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28.

25. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Micro.* 2010;8(7):481-90.
26. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 08//print;2(8):675-80.
27. ARANCIBIA SA, BELTRÁN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F, et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biological Research.* 2007;40:97-112.
28. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O, et al. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infection and Immunity.* 1992; November 1, 1992;60(11):4491-5.
29. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of Periodontal Osseous Destruction and Remodeling: Principles and Implications for Diagnosis and Therapy. *Journal of periodontology.* 2002; 2002/11/01;73(11):1377-91.
30. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clinical and Developmental Immunology.* 2013;2013:7.
31. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2013;15:null-null.
32. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CLH. Osteoclastogenesis, Bone Resorption, and Osteoclast-Based Therapeutics. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003;18(4):599-609.
33. Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontology 2000.* 2013;62(1):163-202.

34. Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, et al. Crevicular Fluid Biomarkers and Periodontal Disease Progression. *Journal of clinical periodontology*. 2014; 12/12;41(2):113-20.
35. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005; Feb;115(2):282-90.
36. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*. 2007;43(1):65-84.
37. Gupta A, Govila V, Saini A. Proteomics – The research frontier in periodontics. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*.5(1):46-52.
38. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1998; Jul;3(1):108-20.
39. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000*. 2013; Feb;61(1):16-53.
40. Schmidlin PR, Beuchat M, Busslinger A, Lehmann B, Lutz F. Tooth substance loss resulting from mechanical, sonic and ultrasonic root instrumentation assessed by liquid scintillation. *J Clin Periodontol*. 2001; Nov;28(11):1058-66.
41. Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*. 2006; Sep;94(1):10-21.
42. Davé S, Van Dyke TE. The link between periodontal disease and cardiovascular disease is probably inflammation. *Oral Diseases*. 2008;14(2):95-101.
43. Tariq M, Iqbal Z, Ali J, Baboota S, Talegaonkar S, Ahmad Z, et al. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. *International journal of pharmaceutical investigation*. 2012; Jul;2(3):106-22.

44. Sharawy AM, Sabharwal K, Socransky SS, Lobene RR. A quantitative study of plaque and calculus formation in normal and periodontally involved mouths. *Journal of periodontology*. 1966; Nov-Dec;37(6):495-501.
45. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000*. 2015;68(1):66-82.
46. Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*. 2015; 2015/04/03;6(3):229-35.
47. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:754857.
48. Bright R, Hynes K, Gronthos S, Bartold PM. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. *Journal of periodontal research*. 2015;50(2):160-72.
49. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*. 2004; Aug;31(8):596-603.
50. Zhang W, Ju J, Rigney T, Tribble G. *Porphyromonas gingivalis* infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. *BMC Oral Health*. 2014; 07/15 04/24/received 07/10/accepted;14:89-.
51. Dumitrescu AL, Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004;31(8):596-603.

52. de Faria Vasconcelos K, Evangelista KM, Rodrigues CD, Estrela C, de Sousa TO, Silva MAG. Detection of periodontal bone loss using cone beam CT and intraoral radiography. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2012;41(1):64-9.
53. Hammer AS, Andersen TH, Eriksen T, Kortegaard HE, Dietz HH, Chriél M. Radiographic evaluation of destructive periodontal disease in blue mink in relation to age and blood morphology. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2005;69(2):128-34.
54. de Souza DM, Prado FdA, Prado MdA, da Rocha RF, de Carvalho YR. Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations. *Journal of Applied Oral Science*. 2010; Sep-Oct;18(5):493-7.
55. Branco-de-Almeida LS, Franco GCN, Castro ML, dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontology*. 2012; May;83(5):664-71.
56. Altman DG, Bland JM. Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician*. 1983; 09//;32(3):307-17.
57. Santos FA, Pochapski MT, Leal PC, Gimenès-Sakima PP, Marcantonio E, Jr. Comparative study on the effect of ultrasonic instruments on the root surface in vivo. *Clinical oral investigations*. 2008; Jun;12(2):143-50.
58. Lippold C, Kirschneck C, Schreiber K, Abukiress S, Tahvildari A, Moiseenko T, et al. Methodological accuracy of digital and manual model analysis in orthodontics - A retrospective clinical study. *Computers in biology and medicine*. 2015; Jul 1;62:103-9.
59. Tanomaru FM, Jorge EG, Guerreiro-Tanomaru JM, Reis JM, Spin-Neto R, Gonçalves M. Two- and tridimensional analysis of periapical repair after endodontic surgery. *Clinical oral investigations*. 2015; Jan;19(1):17-25.

60. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007; 2007/05/01;39(2):175-91.
61. Queiroz-Junior CM, Maltos KLM, Pacheco DF, Silva TA, Albergaria JDS, Pacheco CMF. Endogenous opioids regulate alveolar bone loss in a periodontal disease model. *Life sciences*. 2013;93(12–14):471-7.
62. Misch KA, Yi ES, Sarment DP. Accuracy of cone beam computed tomography for periodontal defect measurements. *Journal of periodontology*. 2006; Jul;77(7):1261-6.
63. Verzeletti GN, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Acta odontologica Scandinavica*. 2007; Nov;65(6):348-51.
64. Susin C, Rosing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta odontologica Scandinavica*. 2003; Oct;61(5):273-7.
65. Castro ML, Franco GC, Branco-de-Almeida LS, Anbinder AL, Cogo-Muller K, Cortelli SC, et al. Down-Regulation of Protease Activated Receptor 2, Interleukin-17 and Other Pro-Inflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. *Journal of periodontology*. 2015; Oct 2:1-11.
66. Jacob SP, Nath S. Rat gingival model for testing drugs influencing inflammation. *INTERNATIONAL ADVISORS*. 2013:8.
67. Gomes DA, Pires JR, Zuza EP, Muscara MN, Herrera BS, Spolidorio LC, et al. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. *Immunological investigations*. 2009;38(2):117-22.
68. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMdF, Fonseca AH, Klein A, Caliri MV, de Francischi JN. Myeloperoxidase Content is a Marker of Systemic Inflammation in a

Chronic Condition: The Example Given by the Periodontal Disease in Rats. Mediators of Inflammation. 2009;2009:7.

69. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. Journal of periodontal research. 2000; Dec;35(6):369-73.

70. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Dis. 2002; Sep;8(5):254-60.

71. Skaleric U, Gaspirc B, McCartney-Francis N, Masera A, Wahl SM. Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease. Infect Immun. 2006; Dec;74(12):7010-3.

Anexo A

**Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Uso Animal
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Processo CEUA 014/2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 014/2013**

Protocolo UEPG – 11166/2013

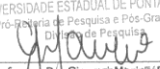
Título – “Caracterização morfológica e imuno-inflamatória do modelo de indução de perda óssea em ratos através do método de ligadura”.**Interessado** – *Gilson César Nobre Franco***Data de Entrada** – 12/06/2013**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/06/2015**Considerações**

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de cento e quarenta ratos.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Diretoria de Pesquisa
Professor Dr. Giovanni Marinho Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPGAv. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264