

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Luciana Dondonis Daudt

EFEITO DA INALAÇÃO DE GLICOCORTICÓIDE SOBRE A PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR EM RATOS WISTAR

Porto Alegre

2009

Luciana Dondonis Daudt

EFEITO DA INALAÇÃO DE GLICOCORTICÓIDE SOBRE A PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR EM RATOS WISTAR

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Cirurgiã-Dentista
pela Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.

Orientador: Prof. Dr. CASSIANO KUCHENBECKER RÖSING

Porto Alegre

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Cassiano Rösing, não apenas pela orientação deste trabalho, mas, principalmente, por ter me dado a oportunidade, logo no início do meu curso de graduação, de fazer parte de um grande grupo de pesquisa, que se destaca pela competência, pelo companheirismo e pela união. Ter vivido essa experiência foi marcante na minha formação. A ti, Cassiano, toda a minha gratidão.

A toda a Equipe de Periodontia desta Faculdade, professores, pós-graduandos e colegas de iniciação científica, agradeço por sempre terem se disposto a dividir comigo os seus conhecimentos, pela convivência alegre e harmoniosa e pelo carinho com o qual sempre me trataram.

Aos integrantes do DOPEG, por terem me proporcionado muito aprendizado e algumas conquistas. Pela amizade e pelos bons momentos no HMIPV e nesta faculdade. Em especial, à Prof^a. Patrícia Weidlich por todas as orientações das quais precisei ao longo desses anos, pelo seu exemplo de comprometimento, seriedade e dedicação. A todos vocês o meu imenso carinho.

Ao Juliano Cavagni, pela proposta deste trabalho e por ter assumido comigo todas as responsabilidades que envolvem a elaboração e a execução de um projeto de pesquisa. A ele, e ao Eduardo José Gaio, meus agradecimentos, por terem tornado isso possível. Muito obrigada por termos sido uma equipe e por toda a ajuda, apoio e orientação ao longo desses meses.

Ao Prof. Cristiano Susin, exemplo de professor, por ter se proposto a me ensinar mais sobre ciência, sobre Odontologia e a sempre unir as duas coisas.

Aos amigos queridos que conquistei ao longo destes cinco anos, pelo carinho, cumplicidade e pelos momentos felizes que compartilhamos. Muito obrigada por tudo.

Por fim, ao meu pai e a minha mãe por terem me ensinado bons valores e bons princípios e por sempre investirem na minha educação. Aos dois, e ao meu irmão, por uma vida de amor, respeito e união. Amo vocês.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”

(Sócrates)

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito da budesonida, por via inalatória, em diferentes concentrações, sobre a perda óssea alveolar induzida por meio de ligadura, em ratos Wistar

Metodologia: Induziu-se doença periodontal por meio da colocação de ligaduras no segundo molar superior de 30 ratos Wistar machos. Como controle intra-grupo, considerou-se o molar contralateral. Os animais foram divididos em três grupos experimentais. O grupo controle foi nebulizado com solução salina (NaCl 0,9%), o grupo teste 30 com 30 µg/dia de budesonida, e o grupo teste 100 com 100 µg/dia do mesmo medicamento, durante 15 dias. A seguir, os animais foram mortos, e as suas maxilas foram removidas. Para o preparo das peças, foi utilizado hipoclorito de sódio 9%. A junção amelo-cementária foi corada com azul de metileno 1%. Análise morfométrica da perda óssea alveolar foi feita por meio de fotografias digitais padronizadas. A distância linear entre junção amelo-cementária e crista óssea alveolar foi mensurada no Programa Image Tool 3.0. Calibragem intra-examinador, testada pelo coeficiente de correlação intra-classe, revelou valor de 0,99, Análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida por teste de comparações múltiplas de Scheffé quando indicado (considerando $\alpha=0,05$).

Resultados: Valores médios de perda óssea alveolar para dentes com ligadura foram de 0,72, 0,70 e 0,77 mm para os grupos controle, teste 30 e teste 100, respectivamente. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada no grupo sem ligadura.

Conclusão: Budesonida, em diferentes concentrações, por via inalatória, não determinou aumento na perda óssea alveolar, induzida por meio de ligadura em ratos Wistar.

Palavras Chave: corticosteróide, doença periodontal, rato, budesonida

ABSTRACT

Aim: to evaluate the effect of inhaled budesonide in different concentrations on ligature induced bone loss in Wistar rats

Materials and Methods: Periodontal disease was induced placing ligatures around upper second molar in 30 male adult Wistar rats. The contralateral molar was considered intragroup control. The animals were divided in three experimental groups. Control group was nebulized with saline solution (NaCl 0,9%), test 30 and test 100 with 30 µg and 100 µg daily budesonide, respectively. The animals were killed at day 15 by decapitation, the maxillae were removed and defleshed with sodium hypochloride 9%. Cementum-enamel junction was stained with methylene blue 1%. Morphometric analysis of the bone loss was performed in digital standard photographs. The distance between cemento-enamel junction and bone crest was measured in Image Tool 3.0 software. Intra-examiner calibration was tested with intraclass correlation coefficient and the value was 0.99. Statistical analysis was performed with one way Anova followed by Scheffé multiple comparison's test. ($\alpha=0.05$).

Results: Mean bone loss values for teeth with ligature were 0.72, 0.7 and 0.77 mm for control, test 30 and test 100 respectively. No statistically significant differences were found in teeth without ligature

Conclusion: Inhaled budesonide in different concentrations did not increase ligature induced alveolar bone loss in male Wistar rats.

Keywords: Corticosteroids, periodontal disease, rat, budesonide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. METODOLOGIA	10
2.1. Delineamento do Estudo	10
2.2. Cálculo amostral	11
2.3. Descrição da amostra	11
2.4. Procedimentos prévios.....	11
2.5. Colocação das ligaduras.....	12
2.6. Randomização	12
2.7. Grupos experimentais	13
2.8. Preparo da Medicação	13
2.9. Câmara de ventilação forçada e administração da medicação.....	14
2.10. Tratamento por Inalação	14
2.11. Saúde dos animais.....	15
2.12. Morte dos animais.....	15
2.13. Preparo das peças	16
2.14. Descarte dos Animais	16
2.15. Análise Morfométrica	16
2.16. Cegamento do examinador	18
2.17. Reprodutibilidade	18
2.18. Análise estatística	18
2.19. Considerações Éticas	19
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são doenças de natureza infecto-inflamatória que acometem os periodontos de proteção e de inserção. Sua etiopatogenia caracteriza-se por uma resposta inflamatória local que, frente à presença de um biofilme bacteriano provoca, em indivíduos suscetíveis, destruição dos tecidos de sustentação dos dentes (Page e Kornman, 1997)

É consenso na literatura que, apesar de uma infecção por bactérias ser necessária para a quebra da homeostase tecidual, esta parece não ser suficiente para que se forme uma bolsa periodontal, sendo a resposta do hospedeiro a estes microrganismos a moduladora da destruição periodontal (Lindhe, Hamp *et al.*, 1973). Assim, tanto em casos de hiper-resposta, quanto em casos de imunossupressão, uma piora na condição periodontal pode ser identificada (Kinane e Marshall, 2001).

A manifestação das periodontites também é sabidamente influenciada por alguns fatores ambientais, comportamentais e biológicos. Entre esses fatores estão alguns microrganismos componentes do biofilme subgingival (Socransky e Haffajee, 2005), o fumo (Bergstrom, Eliasson *et al.*, 2000) e o diabetes (Taylor, Burt *et al.*, 1998); (Borrell e Papapanou, 2005). Existem ainda outros indicadores que têm sido apontados como modificadores do processo saúde/doença periodontal, como fatores socioeconômicos (Borrell, Burt *et al.*, 2004) estresse (Breivik, Thrane *et al.*, 1996), polimorfismos genéticos (Kinane, Shiba *et al.*, 2005), menopausa e osteoporose (Haas, Rosing *et al.*, 2009), consumo excessivo de álcool (Tezal, Grossi *et al.*, 2004), obesidade (Dalla Vecchia, Susin *et al.*, 2005) e uso de alguns medicamentos, como a Fenitoína e Ciclosporina (Kinane e Marshall, 2001).

Em relação à influência do uso de antiinflamatórios como moduladores das doenças periodontais, a literatura é mais abrangente no estudo do efeito dos antiinflamatórios não esteróides (AINE's).

Apesar de os AINE's serem o tipo de agente modulador da resposta do hospedeiro com os resultados mais promissores, ao realizar uma revisão sistemática da literatura, Reddy, Geurs *et al.* 2003 concluem que são necessários mais estudos capazes de gerar maiores níveis de evidência científica para que o seu uso possa ser amplamente indicado como adjunto à terapia periodontal.

Estudos relacionando o uso de antiinflamatórios esteróides (AIE's) e sua relação com as doenças periodontais ainda são escassos e seus resultados são controversos. Cavagni, Soletti *et al.* 2005 e Fernandes, De Almeida *et al.* 2009 observaram que doses altas de corticosteróides causaram, em ratos, uma maior perda óssea alveolar induzida por ligadura. Em contrapartida, Breivik, Gundersen *et al.* 2006 relataram menor perda óssea em grupos experimentais de ratos adultos submetidos à dexametasona em período neonatal. Vale ressaltar que o último estudo citado utilizou menores concentrações da medicação. Estudos avaliando o papel do uso de AIE's sobre as estruturas periodontais de humanos também foram realizados. Safkan e Knuutila 1984 realizaram um estudo prospectivo e observaram que pacientes com esclerose múltipla sob tratamento com AIE's tiveram menor altura óssea alveolar quando comparados ao controle saudável e que não fazia uso da medicação. Já Markitziu, Zafiroopoulos *et al.* 1990, ao avaliarem 19 pacientes adultos, sete não-medicados e 12 sob terapia com Prednisona, observaram que diferenças significativas entre os grupos foram encontradas somente nos parâmetros de sangramento e recessão gengivais, e não na altura óssea alveolar.

Medicações a base de corticosteróides por via inalatória têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de doenças obstrutivas pulmonares como, por exemplo, a asma. Sabe-se que a utilização de glicocorticóides por essa mesma via de administração caracteriza-se por promover menores concentrações sistêmicas da droga, causando efeitos adversos menos pronunciados (Tattersfield, Knox *et al.*, 2002). Ainda assim, entre alguns dos efeitos adversos que têm sido reportados estão o aumento dos casos de catarata (Wang, Rochtchina *et al.*, 2009), e de glaucoma (Garbe, Suissa *et al.*, 1998), a redução de densidade óssea mineral (Smith, Phillips *et al.*, 1999); (Wong, Walsh *et al.*, 2000); (Walsh, Lewis *et al.*, 2002) e o aumento do risco de fraturas, como consequência da osteoporose. Dessa forma, é lícito supor que a utilização desse tipo de droga, mesmo que através da via inalatória, seria capaz de trazer alguma repercussão sobre as estruturas ósseas periodontais.

A budesonida é um glicocorticóide amplamente utilizado para o controle e alívio da falta de ar em pacientes com asma. Quando administrada através da via respiratória, tem efeito antiinflamatório tópico. Sua ação antiinflamatória envolve

células T, eosinófilos e mastócitos e provoca a inibição da liberação dos mediadores inflamatórios e das respostas imunes mediadas por citocinas (Lazo, 2007). O uso da budesonida poderia influenciar a patogênese da doença periodontal através da sua ação nos linfócitos T, o que diminuiria a produção de citocinas, como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6, e da sua inibição dos mediadores químicos e inflamatórios, como PGE2, todos sabidamente envolvidos na destruição do tecido conjuntivo e na reabsorção do osso alveolar (Kinane e Lappin, 2001; Holzhausen, Rossa Junior *et al.*, 2002).

Grande parte dos estudos realizados com antiinflamatórios, não esteróides e esteróides, até o presente, momento utilizou apenas altas doses da medicação, situação na qual não é possível inferir que os desfechos avaliados são dose-dependentes. Ainda, trabalhos avaliando o papel da utilização de drogas antiinflamatórias esteróides inaladas sobre as estruturas periodontais de ratos são inexistentes. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da Budesonida inalatória, em diferentes concentrações, sobre a perda óssea alveolar induzida por meio de ligadura em ratos Wistar.

2. METODOLOGIA

2.1. Delineamento do Estudo

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, randomizado, controlado, cego e em modelo animal. Seu delineamento está estruturado em forma de fluxograma (Figura 1).

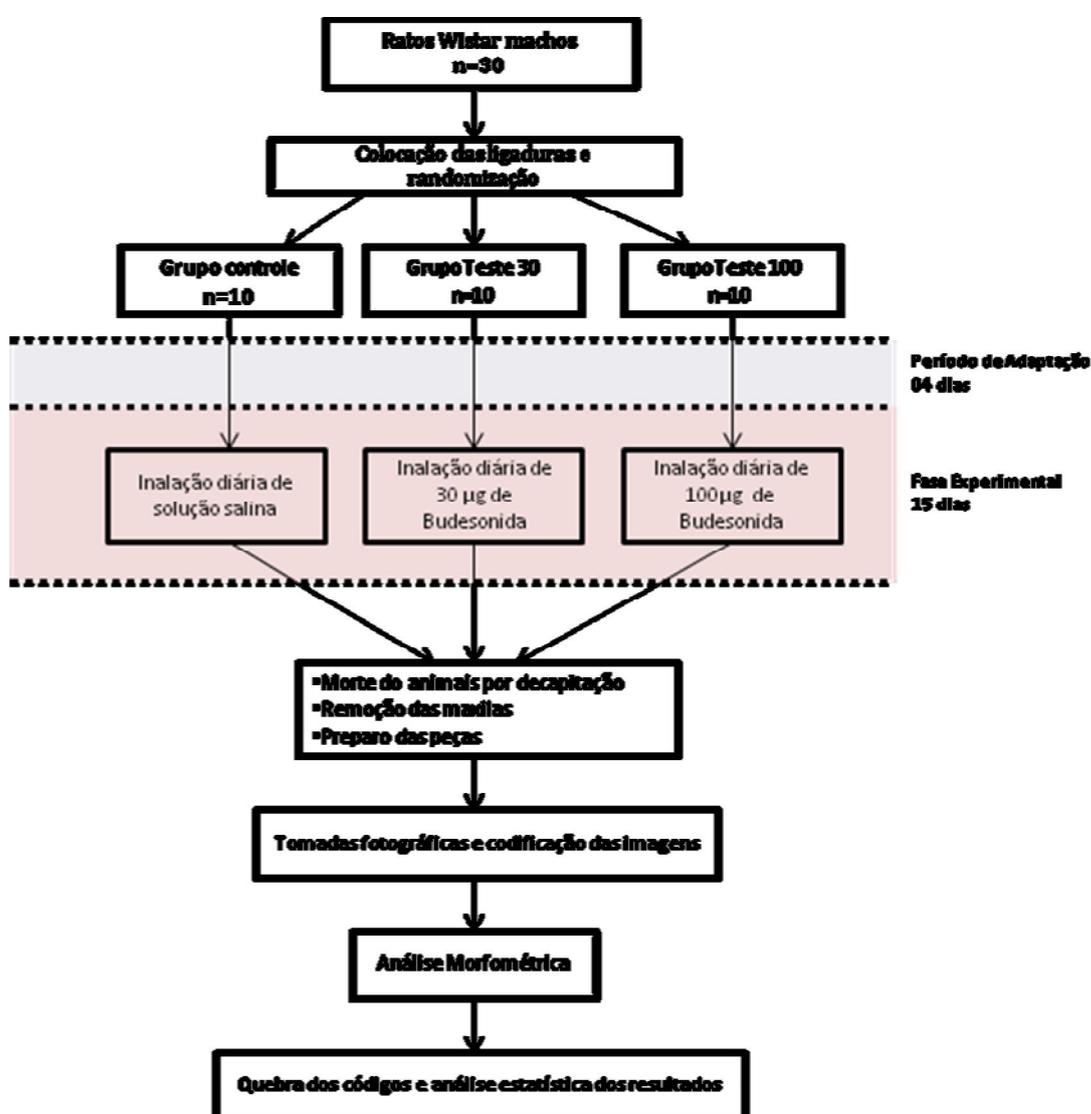


Figura 1. Fluxograma com o delineamento do estudo.

2.2. Cálculo amostral

O cálculo de amostra foi baseado nos resultados do estudo realizado por Cavagni, Soletti *et al.* 2005 que avaliou o efeito da dexametasona sobre a perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos e utilizou metodologia semelhante à deste trabalho.

Assumindo-se como relevante uma diferença na perda óssea alveolar de 0,16mm, levando-se em consideração a variabilidade dos dados e aceitando erros alfa e beta de 5 e 20%, um mínimo de 9 animais por grupo foi considerado necessário. Em função de possíveis perdas de animais/espécimes, um número de 10 animais por grupo foi determinado.

2.3. Descrição da amostra

A amostra foi composta de trinta ratos Wistar, machos, com 60 dias de vida e com peso médio de 225g.

Ao longo do período experimental, os animais permaneceram no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL), em ambiente climatizado (20°C) e estiveram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos receberam ração padronizada e água *ad libitum*.

2.4. Procedimentos prévios

Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados em balança digital (Marte, modelo AS100), randomizados e agrupados, conforme grupo experimental, em seis caixas-moradia com cinco animais em cada uma. Após, os mesmos receberam numeração de um a dez, realizadas através de marcações com caneta permanente no rabo, e as caixas identificadas de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam (ver randomização).

A fim de diminuir o estresse gerado pelo efeito de novidade, os animais foram expostos à câmara de ventilação forçada durante um período de cinco minutos diários, sem a nebulização de qualquer solução, ao longo de quatro dias, previamente ao início do período experimental. Tal procedimento constituiu-se na colocação dos animais na câmara de ventilação forçada e acionamento do nebulizador, durante o período acima citado.

2.5. Colocação das ligaduras

Induziu-se doença periodontal em todos os animais através da colocação de ligadura no segundo molar superior da hemiarcada direita de cada rato, sendo o molar contralateral o controle intra-grupo.

A colocação da ligadura foi realizada mediante anestesia geral, sob supervisão de um médico veterinário. O protocolo anestésico utilizado foi composto de um fármaco dissociativo (Vetanarcol® quetamina 5%) administrado concomitante a um fármaco miorrelaxante (Kensol® xilazina 2%). Os dois fármacos na concentração anteriormente citada foram misturados na proporção de 1:1 (ml) em uma mesma seringa. Uma concentração de 0,2 ml/100g desta mistura foi administrada por via intramuscular, promovendo, assim, anestesia geral. Posicionou-se o fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson®, São Paulo, SP, Brasil) nos espaços interproximais do dente, com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo, e na face vestibular atou-se um nó. Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram a metodologia proposta por Sallay, Sanavi *et al.* 1982 e por Galvao, Chapper *et al.* 2003.

2.6. Randomização

A randomização foi realizada a partir de sorteio utilizando uma urna. Esta continha a identificação de dez elementos de cada um dos três grupos experimentais.

2.7. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais de dez ratos. Um dos grupos foi considerado controle, ao qual se administrou solução salina. Aos demais grupos foram administradas soluções de Budesonida 30 µg/dia (teste 30) e 100µg/dia (teste 100).

2.8. Preparo da Medicação

A escolha das doses do medicamento estudado baseou-se em dados prévios da literatura. O estudo de Elias, Sagua *et al.* 2004 verificou que uma dose de 30 µg/dia, por 15 dias (teste 30), foi capaz de causar alterações de comportamento em animais. Já em seres humanos, 100 µg/dia (teste 100) é considerada a menor dose terapêutica recomendada para tratamento da asma brônquica (Lazo, 2007).

Previamente ao início do período experimental, verificou-se a capacidade de nebulização do aparelho por meio de múltiplas nebulizações de 5 minutos cada. O volume da solução nebulizada permaneceu o mesmo durante toda a simulação (1,1 ml a cada 5 minutos de nebulização). É importante ressaltar que essa simulação foi realizada utilizando o aparato tal qual ocorreu no período experimental (Ver o item “tratamento por inalação”).

O preparo da medicação foi realizado pelos pesquisadores por meio da diluição de budesonida, sob a forma de suspensão para nebulização (Pulmicort®, 0,5 mg/ml, (Laboratório AstraZeneca, Cotia, SP, Brasil)). Baseado na capacidade de nebulização do aparelho em 5 minutos (1,1 ml), procedeu-se a diluição de 2,7 ml da suspensão em 97,3 ml de solução salina (NaCl 0,9%) (teste 30) e de 9,1 ml de budesonida em 90,9 ml de solução salina (teste 100).

A fim de verificar a capacidade de nebulização do aparelho no decorrer do estudo, foram realizadas semanalmente mensurações do volume restante da solução no reservatório. Não foram observadas alterações na quantidade nebulizada.

2.9. Câmara de ventilação forçada e administração da medicação

Para a inalação das soluções pelos animais, utilizou-se uma câmara de ventilação forçada de acordo com a metodologia empregada por Elias, Sagua *et al.* 2004. A câmara consiste em um dispositivo de acrílico transparente com 3 mm de espessura e com dimensões de 22 cm de altura, 22 cm de largura e 22 cm de comprimento, dividida em quatro células de igual tamanho e coberta por tampa removível de mesmo material. No centro da tampa, há uma perfuração que permite a conexão com o aparato de nebulização (NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2).

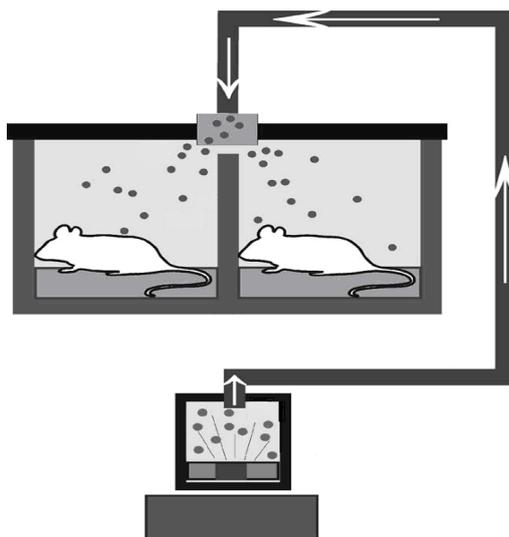


Figura 2. Desenho esquemático da caixa de ventilação forçada (Adaptado de (Elias, Sagua *et al.*, 2004).

2.10. Tratamento por Inalação

Cada grupo experimental foi submetido à câmara de ventilação forçada na seguinte ordem: dois agrupamentos de quatro animais e um agrupamento de dois totalizando, assim, a exposição dos dez animais. Após a colocação deles, a caixa era tampada e selada com fita adesiva (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil) a fim de

que a medicação não fosse perdida durante os procedimentos de nebulização. À caixa e ao reservatório do nebulizador foi acoplada uma cânula para estabelecer a comunicação dos dois dispositivos. O nebulizador então era ligado, e as soluções testes ou controle eram vaporizadas por um período de cinco minutos devidamente cronometrados. Estimou-se que, em um período de cinco minutos, seriam nebulizados 1,1ml das soluções. Concluído o tempo de nebulização, o aparelho era desligado e os animais permaneciam por mais um minuto na caixa a fim de que a solução se dissipasse. Os animais eram, então, devolvidos para suas respectivas caixas-moradia, e a câmara devidamente limpa com água e sabão para remover depósitos da medicação junto às paredes da mesma. Todos os procedimentos de nebulização foram realizados no período da manhã, uma vez ao dia, no mesmo horário, durante o período experimental de 15 dias.

Para garantir o adequado funcionamento do dispositivo, foi realizada semanalmente uma nebulização sem os animais no interior da câmara, a fim de verificar o volume de nebulização. Além disso, mensurou-se o volume restante da solução no reservatório do aparelho após essa nebulização, a fim de verificar possíveis alterações no nebulizador.

2.11. Saúde dos animais

Os ratos foram pesados em balança digital (Marte, modelo AS100) semanalmente, ao longo de todo período experimental, para acompanhamento da sua saúde geral. O peso foi mensurado em gramas, e os valores anotados em tabelas especialmente desenhadas para o presente estudo.

2.12. Morte dos animais

Após 15 dias do início do período experimental os animais foram mortos por decapitação. Esse procedimento foi realizado 24 horas após a última administração da medicação. As maxilas dos animais foram removidas com auxílio de cinzéis e, em seguida, armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a

10%. Todos os potes foram etiquetados com o número do animal e do grupo ao qual cada rato pertencia.

2.13. Preparo das peças

Os procedimentos de preparo das peças e de análise morfométrica foram realizados no Laboratório de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seguiram metodologia proposta por Fernandes, Gaio *et al.* 2007. Para a remoção dos tecidos moles, as maxilas foram imersas em hipoclorito de sódio com concentração de 9% de cloro ativo (Mazarollo, Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil) durante cinco horas e, então, os tecidos foram mecanicamente removidos. Concluída essa parte, as peças foram lavadas e secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, todas elas foram coradas com azul de metileno a 1% durante um minuto e, então, novamente lavadas e secas para se remover excessos da solução.

2.14. Descarte dos Animais

Após a morte e obtenção das peças para análise morfométrica, os ratos foram colocados em sacos plásticos e encaminhados para descarte seguindo o protocolo do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL).

Cabe ressaltar que outros importantes órgãos e tecidos foram removidos para futuras avaliações do efeito da Budesonida inalatória, tais como: pulmão, fígado, coração, cérebro, sangue e língua.

2.15. Análise Morfométrica

Para a tomada das fotografias utilizou-se uma câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Ayutthaya, Tailândia),

com lente macro 100, acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que o cone ficasse o mais paralelo possível em relação ao solo.

Confeccionou-se um aparato utilizando pasta pesada de Silicona de Adição (3MESPE®, Seefeld, Alemanha) para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua através de um fragmento de cera 07 (Newwax 7, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo (Figura 3). Foram tomadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das hemimaxilas. Um examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais, calculou as medidas das distâncias da junção amelo-cementária à crista óssea através do programa Image Tool 3.0. (UTHSCPA, San Antonio, TX, USA). Foram realizadas 5 mensurações em cada face (duas na raiz distal, duas na raiz mesial e uma na região de furca). As medidas, realizadas em pixels, foram convertidas em milímetros.



Figura 3. Peça fixada à régua milimetrada através de um fragmento de cera 07 para a tomada fotográfica.

2.16. Cegamento do examinador

O cegamento do examinador ocorreu antes da análise morfométrica. Após as tomadas fotográficas, todas as fotos foram codificadas através de um sorteio numérico por outro pesquisador do estudo, de modo que o examinador não pudesse saber, no momento da análise, a que grupo pertencia cada peça.

Após a conclusão das medidas, o código foi quebrado e as fotos renomeadas de acordo com o número do animal e o grupo experimental a que cada foto pertencia.

2.17. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade das medidas morfométricas foi aferida a partir da dupla mensuração de 10% das fotografias pelo mesmo examinador. A escolha das fotografias se deu de forma aleatória e ocorreu após o intervalo de uma semana. O Coeficiente de Correlação Intra-Classe entre as duas medidas foi de 0,99, considerado excelente.

2.18. Análise estatística

Após a verificação da distribuição normal dos dados, a análise estatística foi realizada da seguinte maneira:

- Médias e desvio padrão do peso dos animais ao início, sétimo e décimo quarto dia da fase experimental foram comparadas entre os três grupos experimentais, através de Análise de Variância (Anova), por meio do software SPSS (versão 12) para Windows.
- Médias e desvio-padrão da perda óssea alveolar (convertida em milímetros) das faces vestibulares e palatinas, nos dentes com e sem ligadura dos três grupos, foram comparadas através de Anova de uma via. Possíveis diferenças estatísticas entre os lados com e sem ligadura nos diferentes grupos experimentais foram avaliadas pelo teste Post-Hoc de Scheffé.

O nível de significância estabelecido para o presente estudo foi de 5%.

A unidade amostral utilizada para o presente estudo foi o rato.

2.19. Considerações Éticas

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e obedece às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS), tendo a sua aprovação registrada no protocolo de número 2008128.

3. RESULTADOS

A Figura 4 demonstra a evolução do peso dos animais ao longo do Período experimental. Observa-se que todos os grupos ganharam peso durante o estudo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nesse aspecto.

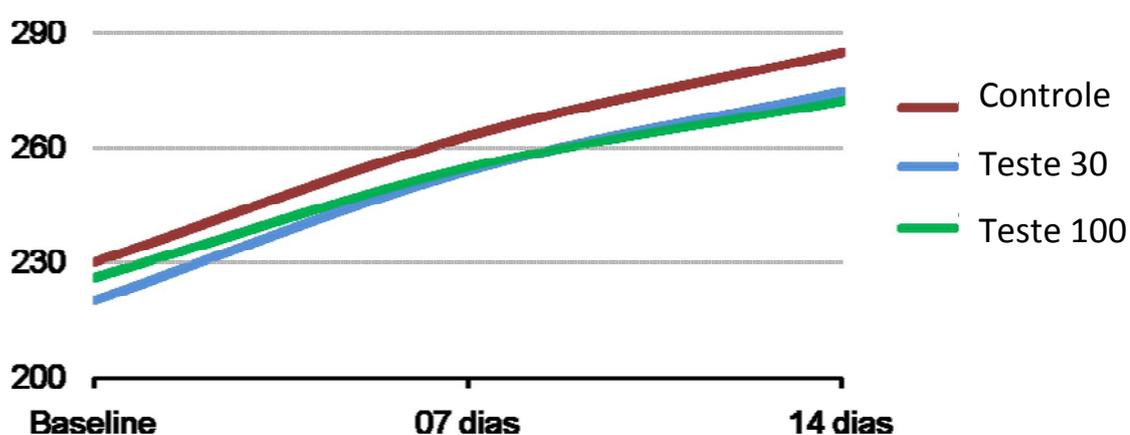
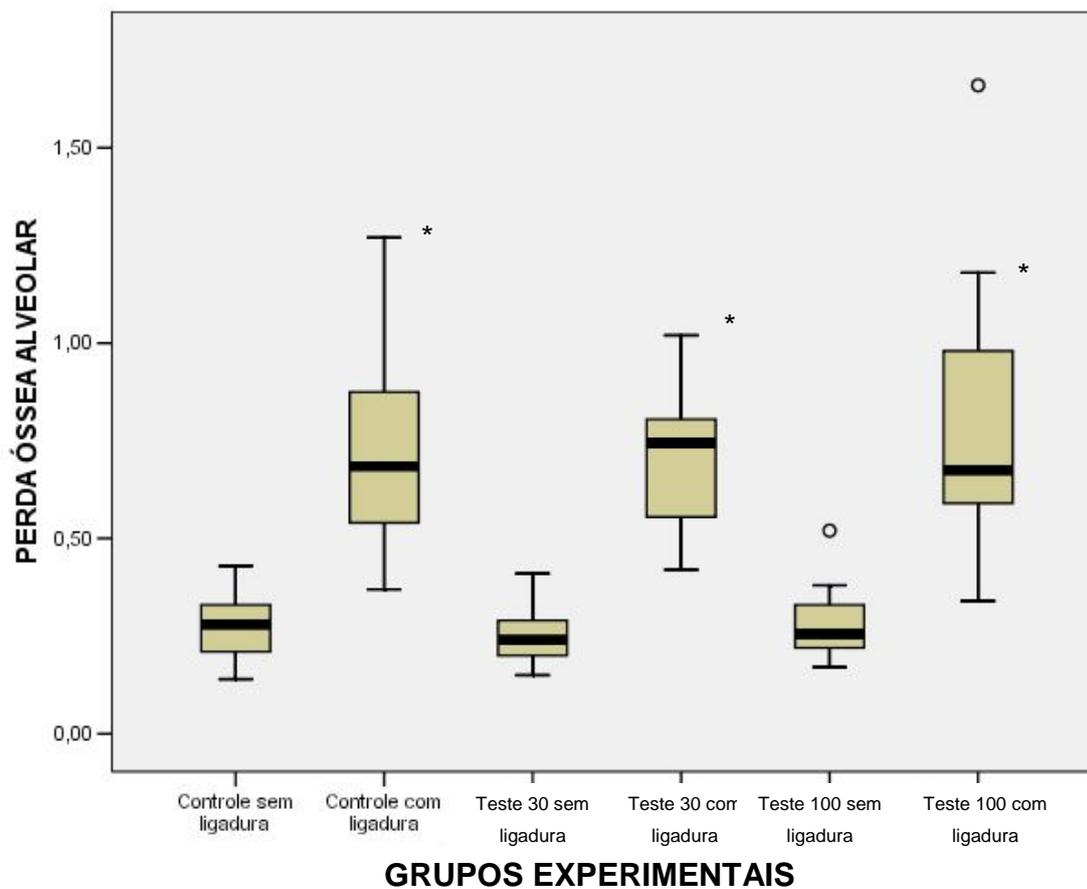


Figura 4. Peso médio dos animais (g) de acordo com o grupo experimental ao longo do período experimental

A Figura 5 ilustra a perda óssea alveolar em milímetros para os diferentes grupos experimentais após 15 dias da colocação das ligaduras. Observa-se, nos dentes com ligadura, em todos os grupos, que a média de perda óssea alveolar foi maior que nos dentes sem ligadura ($p < 0,05$). Nos dentes com ligadura, os valores médios foram de 0,72, 0,70 e 0,77mm para os grupos controle, teste 30 e teste 100, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos. Nos dentes sem ligadura as médias foram de 0,27, 0,25 e 0,27mm para os grupos controle, teste 30 e teste 100, respectivamente. Semelhantemente, não houve diferenças significativas entre os grupos.



* $p < 0,05$, teste de anova intra-grupo; ○ Outliers

Figura 5. Mediana e intervalo inter-quartis (25% e 75%) da perda óssea alveolar média nos diferentes grupos experimentais de acordo com a presença ou não de ligadura.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a perda óssea alveolar induzida em ratos submetidos a diferentes dosagens de budesonida em relação a um grupo que recebeu inalação de solução salina. Não foram detectadas diferenças significativas na perda óssea entre os diferentes grupos experimentais. Sabe-se que os estudos em animais nem sempre possibilitam que os resultados sejam extrapolados diretamente para seres humanos. Entretanto, o modelo animal é importante para que se estude e para que se conheça os mecanismos de ação de alguns medicamentos e sua possível influência no desenvolvimento da doença periodontal.

O presente estudo utilizou trinta ratos Wistar machos para avaliar a perda óssea alveolar em três grupos experimentais distintos onde um, o grupo controle, inalou solução salina e os outros dois, grupos teste, inalaram diferentes concentrações de budesonida, um antiinflamatório corticosteróide. A escolha dos animais machos se deu para evitar que os fatores hormonais em fêmeas pudessem interferir negativamente nos resultados. Para a alocação dos ratos em cada um dos três grupos experimentais fez-se a randomização dos animais através de sorteio. Após a conclusão do período experimental, um examinador realizou a análise morfométrica das peças. Esse examinador foi previamente treinado para fazer as mensurações e não conhecia, no momento das análises, a qual grupo experimental cada imagem pertencia. Todos esses princípios foram seguidos para aumentar a validade interna do estudo, possibilitando uma diminuição de fatores intervenientes que pudessem ser responsáveis pelos achados (Rösing e Susin, 1999). Da mesma forma, uma estimativa amostral foi realizada no presente estudo para que se pudesse ter uma idéia do número mínimo de animais por grupo. O presente estudo, portanto, tem amostra adequada, sendo também similar a outros estudos que utilizaram modelo de perda óssea alveolar induzida em ratos (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005).

Para a avaliação da saúde geral dos animais fez-se a pesagem dos ratos em três momentos do trabalho. Pode-se inferir que o estado de saúde geral desses manteve-se bom, pois ao longo do estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Todos apresentaram

ganho de peso, o que era esperado, uma vez que os animais encontravam-se em fase de crescimento.

Sobre o modelo de indução de doença empregado neste trabalho, poder-se-ia supor que a perda óssea apresentada tenha ocorrido apenas em função da remodelagem óssea natural que ocorre ao longo do envelhecimento dos ratos. Entretanto, trabalhos reportaram que, quando se induz doença periodontal utilizando-se o modelo de ligadura, a perda óssea alveolar em ratos livres de bactérias é significativamente inferior a perda óssea alveolar em ratos contaminados com bactérias periodontopatógenas e submetidos ao mesmo modelo de indução de doença (Amstad-Jossi e Schroeder, 1978; Crawford, Taubman *et al.*, 1978).

Apesar de a análise histométrica ser o padrão ouro para a medição de perda óssea alveolar em ratos, a análise morfométrica é um instrumento de mensuração validado pela literatura. Ela pode ser uma alternativa à histometria, sempre que o objetivo do estudo envolver mensuração de perda óssea, por ser um método mais rápido, mais fácil e mais barato (Fernandes, Gaio *et al.*, 2007). Além disso, a visualização direta dos defeitos pode ser conferida nesse tipo de análise, não sofrendo a interferência dos planos de corte histológico.

Em relação à administração de corticóide, ainda que Elias, Sagua *et al.* 2004 tenham verificado a eficácia da caixa de ventilação forçada como mecanismo para inalação de antiinflamatório esteróide por ratos, neste estudo não foi possível observar um padrão de perda óssea alveolar diferente entre os grupos experimentais. Não se deveria, portanto, inferir que a ausência de resultados significativos pudesse ser devida a não absorção da medicação. Acredita-se que esse fato se deva à administração de corticosteróide através da via inalatória ter um efeito antiinflamatório prioritariamente tópico, promovendo menores concentrações sistêmicas da droga. Mesmo que possa haver alguns efeitos adversos, estes são sempre menos pronunciados quando comparados aos efeitos adversos causados pela administração de corticosteróide através de via oral ou injetável (Tattersfield, Knox *et al.*, 2002). Essa é a razão específica de por que se utilizou medicação tópica e não por via sistêmica.

Para a realização deste trabalho, as concentrações escolhidas foram de 30µg/ml, concentração capaz de provocar alteração de comportamento em ratos

através do método empregado por Elias, Sagua *et al.*, 2004, e de 100 µg/ml, a menor dose recomendada para tratamento em humanos (Lazo, 2007) O objetivo de se testar duas concentrações diferentes da medicação foi verificar se haveria uma relação dose-resposta, ou seja, se haveria um padrão de perda óssea diferente dependendo da concentração administrada. Pode-se observar, através dos resultados apresentados que não se encontrou essa relação no presente estudo.

O tempo experimental utilizado neste trabalho foi de 15 dias. Estudos de perda óssea alveolar induzida em ratos variam entre 15 e 60 dias, na sua maioria. Através do estudo de Kuhr, Popa-Wagner *et al.* 2004, que teve o propósito de verificar a destruição periodontal ao longo de sessenta dias em ratos com doença periodontal induzida por ligadura, verificou-se que a maior diferença intra-grupo de perda óssea alveolar ocorre nos primeiros quinze dias da indução da doença. Após esse período, a perda óssea atingiria um platô. Seguindo esses resultados, o presente estudo teve a sua fase experimental com duração de quinze dias e, ao final, pode-se observar um padrão de perda óssea similar a estudos com metodologia semelhante e período experimental mais longo, de trinta dias (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados neste estudo participam da construção do conhecimento etiopatogênico das doenças periodontais. A ausência de diferenças significativas permite inferir que não há efeito da medicação sobre a perda de tecido periodontal. Isso tem como possibilidade de interpretação que, provavelmente, a utilização de budesonida tópica não tem efeito promissor como modulador da resposta do hospedeiro, para estudos futuros. Por outro lado, é importante que se tenha claro que um medicamento com uso disseminado, como a budesonida, é aparentemente seguro em relação aos tecidos periodontais. Estudos sobre outros efeitos tópicos da budesonida nas mucosas são encorajados.

Conclusão

Através do presente estudo pode-se concluir que diferentes concentrações de Budesonida inalatória não interferem na perda óssea alveolar induzida por meio de ligadura em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS

Amstad-Jossi M., H.E. Schroeder. Age-related alterations of periodontal structures around the cement-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. J Periodontal Res, v.13, n.1, Jan, p.76-90.1978

Bergstrom, J., S. Eliasson, *et al.* Exposure to tobacco smoking and periodontal health. J Clin Periodontol, v.27, n.1, Jan, p.61-8. 2000.

Borrell, L. N., B. A. Burt, *et al.* Social factors and periodontitis in an older population. Am J Public Health, v.94, n.5, May, p.748-54. 2004.

Borrell, L. N. e P. N. Papapanou. Analytical epidemiology of periodontitis. J Clin Periodontol, v.32 Suppl 6, p.132-58. 2005.

Breivik, T., Y. Gundersen, *et al.* Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. J Periodontal Res, v.41, n.1, Feb, p.23-32. 2006.

Breivik, T., P. S. Thrane, *et al.* Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. Eur J Oral Sci, v.104, n.4 (Pt 1), Aug, p.327-34. 1996.

Cavagni, J., A. C. Soletti, *et al.* The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. Braz Oral Res, v.19, n.4, Oct-Dec, p.290-4. 2005.

Dalla Vecchia, C. F., C. Susin, *et al.* Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. J Periodontol, v.76, n.10, Oct, p.1721-8. 2005.

Elias, P. C., D. Sagua, *et al.* Chronic aerial exposure to glucorticoids or beta-agonists affects avoidance learning and exploratory motivation in rats. Behav Brain Res, v.149, n.1, Feb 4, p.95-105. 2004.

Fernandes, L. A., J. M. De Almeida, *et al.* Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. J Clin Periodontol, v.36, n.3, Mar, p.219-28. 2009.

Fernandes, M. I., E. J. Gaio, *et al.* Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. Braz Oral Res, v.21, n.3, Jul-Sep, p.216-21. 2007.

Galvao, M. P., A. Chapper, *et al.* Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. Pesqui Odontol Bras, v.17, n.1, Jan-Mar, p.56-62. 2003.

Garbe, E., S. Suissa, *et al.* Association of inhaled corticosteroid use with cataract extraction in elderly patients. JAMA, v.280, n.6, Aug 12, p.539-43. 1998.

Haas, A. N., C. K. Rosing, *et al.* Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. J Periodontol, v.80, n.9, Sep, p.1380-7. 2009.

Holzhausen, M., C. Rossa Junior, *et al.* Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontol, v.73, n.9, Sep, p.1030-6. 2002.

Kinane, D. F. e D. F. Lappin. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. Acta Odontol Scand, v.59, n.3, Jun, p.154-60. 2001.

Kinane, D. F. e G. J. Marshall. Periodontal manifestations of systemic disease. Aust Dent J, v.46, n.1, Mar, p.2-12. 2001.

Kinane, D. F., H. Shiba, *et al.* The genetic basis of periodontitis. Periodontol 2000, v.39, p.91-117. 2005.

Kuhr, A., A. Popa-Wagner, *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodontal Res, v.39, n.2, Apr, p.101-6. 2004.

Lazo, J. S. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill. 2007

Lindhe, J., S. E. Hamp, *et al.* Experimental periodontitis in the beagle dog. Int Dent J, v.23, n.3, Sep, p.432-7. 1973.

Markitziu, A., G. Zafiroopoulos, *et al.* Periodontal alterations in patients with pemphigus vulgaris taking steroids. A biannual assessment. J Clin Periodontol, v.17, n.4, Apr, p.228-32. 1990.

Page, R. C. e K. S. Kornman. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000, v.14, Jun, p.9-11. 1997.

Reddy, M. S., N. C. Geurs, *et al.* Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. Ann Periodontol, v.8, n.1, Dec, p.12-37. 2003.

Rösing, C. K. e C. Susin. Praticando Odontologia Baseada em Evidências. Canoas: Editora da Ulbra. 1999

Safkan, B. e M. Knuuttila. Corticosteroid therapy and periodontal disease. J Clin Periodontol, v.11, n.8, Sep, p.515-22. 1984.

Sallay, K., F. Sanavi, *et al.* Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. J Periodontal Res, v.17, n.3, May, p.263-74. 1982.

Smith, B. J., P. J. Phillips, *et al.* Asthma and chronic obstructive airway diseases are associated with osteoporosis and fractures: a literature review. Respirology, v.4, n.2, Jun, p.101-9. 1999.

Socransky, S. S. e A. D. Haffajee. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000, v.38, p.135-87. 2005.

Tattersfield, A. E., A. J. Knox, *et al.* Asthma. Lancet, v.360, n.9342, Oct 26, p.1313-22. 2002.

Taylor, G. W., B. A. Burt, *et al.* Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. Ann Periodontol, v.3, n.1, Jul, p.30-9. 1998.

Tezal, M., S. G. Grossi, *et al.* Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. J Clin Periodontol, v.31, n.7, Jul, p.484-8. 2004.

Walsh, L. J., S. A. Lewis, *et al.* The impact of oral corticosteroid use on bone mineral density and vertebral fracture. Am J Respir Crit Care Med, v.166, n.5, Sep 1, p.691-5. 2002.

Wang, J. J., E. Rochtchina, *et al.* Use of inhaled and oral corticosteroids and the long-term risk of cataract. Ophthalmology, v.116, n.4, Apr, p.652-7. 2009.

Wong, C. A., L. J. Walsh, *et al.* Inhaled corticosteroid use and bone-mineral density in patients with asthma. Lancet, v.355, n.9213, Apr 22, p.1399-403. 2000.