

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**ESTUDO DA AÇÃO DA NIFEDIPINA SOBRE O ESTADO GENGIVAL DE RATOS,
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.**

FELIPE KRYVORUCHCA DE MATTOS

Porto Alegre – RS
2010

FELIPE KRYVORUCHCA DE MATTOS

Estudo da ação da nifedipina sobre o estado gengival de ratos, análise
histopatológica.

Trabalho de conclusão do curso de Odontologia
da Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

ORIENTADOR
Profa. Dra. MARILENE ISSA FERNANDES
CO-ORIENTADOR
Prof. Dr. PANTELIS VARVAKI RADOS

Porto Alegre, 2010

RESUMO

O aumento de volume gengival como um efeito adverso do uso de nifedipina já foi relatado na literatura, estando associado a presença de um padrão inflamatório bem estabelecido. **Objetivo:** Avaliar a repercussão da nifedipina em situação de saúde e periodontite, em ratos, sobre os tecidos gengivais epitelial e conjuntivo. **Metodologia:** A amostra envolveu blocos histológicos processados a partir de 20 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos com cinco ratos cada. Dois grupos foram considerados controle e dois grupos teste, sendo que esses foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura. Dos grupos, um teste e outro controle receberam administração diária de solução fisiológica ou nifedipina 50mg/kg/dia. O tempo total do experimento foi de 30 dias. Dois cortes histológicos, de 4µm cada, no sentido vestibulo/lingual foram coletados de cada bloco. Foi feita uma análise histológica qualitativa avaliando a morfologia do epitélio interno, juncional e sulcular, e uma análise histológica quantitativa relativa à intensidade do infiltrado inflamatório e a quantidade de fibras colágenas. **Resultados:** A análise histológica qualitativa somente apresentou diferenças estatisticamente significantes na avaliação da orientação dos feixes de fibras conjuntivas. A análise histológica quantitativa demonstrou uma maior intensidade de infiltrado inflamatório nos grupos onde periodontite foi induzida e maior quantidade de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio. **Conclusão:** Todos os grupos avaliados apresentaram alterações epiteliais, porém estatisticamente não significativas. A avaliação das alterações do tecido conjuntivo resultou em diferença significativa de área entre os grupos teste e controle, principalmente associada com periodontite induzida. As fibras do tecido conjuntivo se mostraram desorganizadas na presença de periodontite induzida, desorganização menor na presença de nifedipina.

ABSTRACT

The gingival overgrowth as a side effect of nifedipine use was already published, being associated with the presence of an inflammatory pattern well established. **Objective:** Evaluate nifedipine repercussion in health and periodontitis situations, on rats, on epithelial and connective gingival tissue. **Materials and methods:** The sample has two histological blocks processed by 20 Wistar male rats, divided in four groups with five rats each. Two groups were considered control groups and two test groups, and the test groups were submitted to a ligature-induced periodontitis experimental model. The groups received daily administration of a saline solution or nifedipine 50mg/kg/day. The total experiment time was 30 days. Two histological slices, 4µm each, in buccal/lingual direction were collected from each block. A descriptive histological analysis was made evaluating the oral, sulcular and junctional epithelia morphology, and a histometric evaluation of the inflammatory infiltrate intensity and the amount of collagen fibers. **Results:** The descriptive histological analysis only showed significant difference in the collagen fibers orientations. The histometric evaluation demonstrated higher inflammatory infiltrate intensity on the ligature-induced periodontitis groups, as well as bigger connective tissue amount. **Conclusion:** All groups evaluated presented epithelial changes, but these changes were not significant. The connective tissue analysis resulted in a statistically significant difference between the areas of test and control groups, mainly when associated with ligature-induced periodontitis. Fibers of the connective tissue were disorganized in presence of induced periodontitis, disorganization smaller in presence of nifedipine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	OBJETIVOS.....	9
3	METODOLOGIA.....	10
	3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA.....	12
	3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUANTITATIVA.....	12
	3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4	RESULTADOS.....	15
5	DISCUSSÃO.....	19
6	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A nifedipina é um medicamento antagonista do cálcio, sendo bloqueador dos canais de cálcio, indicado para pacientes que possuem hipertensão arterial, normalmente de uso diário (WANNMACHER, 2007).

O aumento de volume gengival como um efeito adverso do uso de nifedipina foi pioneiramente descrito por Lederman *et al.* (1984). Nesse relato de caso, os tecidos lembravam clínica e histologicamente a hiperplasia induzida por fenitoína. O aumento de volume gengival foi observado entre um e dois meses após o início da utilização da droga e uma parcial resolução do quadro foi vista com a interrupção do uso.

Um modelo experimental em ratos, com a administração de drogas como a nifedipina, induziu aumento de volume gengival macroscópico em um período de 20 a 30 dias, alcançando um máximo de crescimento em 40 dias, que regrediu espontaneamente com a descontinuidade da droga. A avaliação histológica mostrou um severo infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais dos ratos que usaram a droga. (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996).

Histologicamente, o tecido epitelial gengival associado ao uso de nifedipina apresentou marcada hiperplasia, com longas cristas epiteliais no epitélio sulcular, sem alterações no epitélio juncional. O tecido conjuntivo, em ratos, mostrou densa substância intercelular fibrosa, associada a um infiltrado inflamatório na porção subepitelial (Moriaski, Kato *et al.*, 1993; Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996). As alterações epiteliais e conjuntivas se mostraram mais relacionadas com a severidade do aumento de volume gengival (Spoildorio, Spolidorio *et al.*, 2002). Os mecanismos associados com aumento de volume gengival que melhor explicam sua ocorrência e distribuição, apontam para um modelo multifatorial.

A presença de biofilme é reconhecida pelo sistema de classificação das doenças periodontais como um co-fator associado à etiologia do aumento de volume gengival (Fu, Nieh *et al.*, 1997). No entanto, a presença do biofilme e inflamação gengival por si só, não explicam essa condição. Moriaski, Kato *et al.* (1993), observaram, em ratos Fischer, que a nifedipina levou a um aumento de volume gengival tanto na presença como na ausência de inflamação gengival e biofilme dental, embora esses fatores estivessem associados com um maior efeito da droga. A profundidade de sondagem, também considerada um descritor inflamatório, se mostrou maior no grupo da nifedipina, o que corrobora os achados do estudo de

Isida, Kondoh *et al.*, 1995. Nestes estudos, a profundidade de sondagem foi avaliada clinicamente, sob um microscópio estereoscópico, utilizando uma película de slide com faixas coloridas impressas, com o objetivo de mimetizar uma sonda periodontal. É importante observar que as medidas de profundidade de sondagem podem ser alteradas por diferentes fatores, como situação inflamatória dos tecidos, posição e inclinação da sonda, tipo da sonda e força de sondagem, além do treinamento e calibragem do examinador (Bulthuis, Barendregt *et al.*, 1998; Garnick e Silverstein, 2000). Somado a isto cabe lembrar o diminuto tamanho da união dento-gengival de ratos.

A influência da nifedipina sobre a evolução da periodontite em ratos foi avaliada, e os resultados histométricos foram realizados quantificando o volume de perda óssea na região da bifurcação, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.*, 2003). Morisaki, Kato *et al.* (1993) em uma análise histológica descritiva não observaram perda óssea ou de inserção. Nesses estudos, a sistemática de avaliação dos descritores inflamatórios e de destruição não foram utilizados considerando os critérios atuais de diagnóstico e pesquisa em periodontia. A sistemática usual para determinar perda óssea está associada com a distância da junção amelo-cementária a crista óssea, e não com o volume ósseo na área da furca. Também uma descrição histológica não basta para avaliar níveis de inserção ou perda óssea, principalmente na ausência de um cegamento do examinador.

Fernandes, Gaio *et al.*, 2010 concluíram que o uso da nifedipina por si só não acarretava um aumento de volume gengival em uma situação de saúde periodontal em ratos. Nesta situação foram observadas discretas alterações histopatológicas. Os aumentos de volume gengival em ratos se mostraram dependentes de um padrão inflamatório bem estabelecido, detectado tanto pelo aumento do infiltrado inflamatório como pelo aumento da altura gengival avaliado em cortes histológicos.

Zhang, Miao-Miao *et al.*, 2008 investigaram os efeitos da nifedipina sobre o mecanismo de remodelação do ligamento periodontal de ratos Sprague-Dawley em movimentações ortodônticas. Analisaram as fibras colágenas do ligamento periodontal e determinaram sua orientação utilizando o tricrômico de Masson como coloração. Concluíram que houve um aumento de fibras colágenas na presença da nifedipina durante a movimentação ortodôntica.

The American Journal of Cardiology e o Journal of Periodontology publicaram um consenso em julho de 2009 observando que não existe relato na literatura sobre o efeito dos bloqueadores de canais de cálcio e severidade de doença periodontal.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram investigar:

- A repercussão da nifedipina em situação de saúde e periodontite sobre a morfologia do epitélio.
- A intensidade do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente.
- Analisar a quantidade de tecido conjuntivo adjacente e disposição dos feixes de fibras colágenas.

3 METODOLOGIA

O presente estudo foi um desdobramento do projeto “Estudo da ação da nifedipina sobre o estado gengival de ratos”, aprovado pela Comissão de Pesquisas e Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Odontologia da UFRGS em 09 de dezembro de 2002, sob o número 109/02. Essa parte do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Odontologia da UFRGS, sob o número 15134 envolvendo os mesmos animais.

A amostra compreendeu 20 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, pesando entre 144g e 170g. Os animais foram divididos em quatro grupos que receberam ração padronizada e água *ad libitum*. Dois grupos, com cinco ratos cada foram considerados controle. Um grupo com administração diária 50ml/kg/dia de solução fisiológica (grupo 1), e outro com nifedipina 50mg/kg/dia (grupo 2) (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* 2003), por gavagem. Os grupos teste foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005). Cinco ratos receberam diariamente 50ml/kg/dia de solução fisiológica (grupo 3) e outros cinco receberam nifedipina 50mg/kg/dia (grupo 4) (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* 2003), por gavagem, como mostra a tabela 1. O tempo total de experimento foi de 30.

Tabela 1 – Distribuição da amostra nos diferentes grupos experimentais.

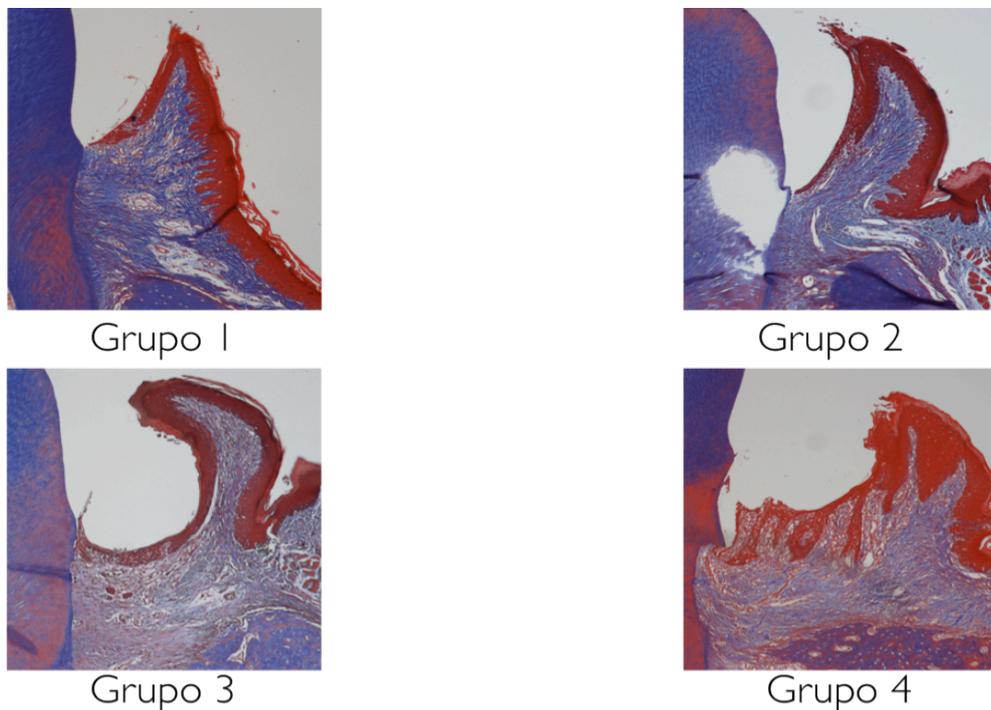
Grupos:	Periodontite induzida por ligadura	Solução administrada
Grupo 1 (5 ratos)	Ausente	Solução Salina
Grupo 2 (5 ratos)	Ausente	Nifedipina 50mg/kg/dia
Grupo 3 (5 ratos)	Presente	Solução Salina
Grupo 4 (5 ratos)	Presente	Nifedipina 50mg/kg/dia

Os ratos foram mortos em câmara de CO₂ e, imediatamente após as maxilas foram removidas e fixadas em formalina neutra tamponada 10%, por um período de 48 horas. Após fixação, as peças foram submetidas ao processo de descalcificação com uma solução de Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%. Esta solução foi trocada diariamente e o período para a total desmineralização durou 40 dias (Anna-Morse, 1945). As peças descalcificadas foram submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina. No momento da inclusão, a face distal do

segundo molar foi posicionada paralela ao solo de forma que ficasse perpendicular ao plano de corte do bloco.

De cada bloco foram feitos dois novos cortes de 4µm cada, no sentido vestibulo/lingual, utilizando a mesma sistemática utilizada no projeto inicial, com o objetivo de realizar novas colorações, sendo uma corada com hematoxilina e eosina (HE) e a outra corada com o tricrômico de Masson, como mostra a figura 1. O número de ratos por grupo foi de 5, pois cinco era o número de blocos de parafina viáveis remanescentes de cada grupo do projeto inicial.

Figura 1 – Imagens de cada grupo coradas com tricrômico de Masson.



As análises histológicas qualitativas e quantitativas foram realizadas na *Unidade de Morfometria e Histometria*, Projeto FAPERGS Proap nº 04/2005, Processo 0410882, sob responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

A análise histológica qualitativa foi em microscópio ótico binocular com aumento de 200 vezes. Os cortes histológicos foram avaliados em toda sua extensão. O examinador desconhecia o grupo experimental ao qual pertencia cada lâmina histológica.

Nos cortes histológicos corados com HE foi avaliada a morfologia do epitélio interno, juncional e sulcular e do epitélio bucal. As características analisadas foram: presença ou não de cristas epiteliais, de ceratina, de espaços intercelulares e de degeneração hidrópica. Previamente a análise foi feita a calibragem intra e inter-examinadores com um coeficiente kappa ponderado de $k > 0,7$.

A disposição dos feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo adjacente ao tecido epitelial foi avaliada e descrita em cortes histológicos corados com o tricrômico de Masson. A disposição dos feixes de fibras foi analisada separadamente na porção adjacente ao epitélio juncional, epitélio sulcular e epitélio bucal.

Previamente as análises foi realizada a calibragem intra e inter-examinadores com um patologista experiente e um coeficiente kappa ponderado de $k > 0,7$. A cada cinco campos avaliados, para a calibragem intra-examinador, um deles foi reavaliado até ser atingido o coeficiente kappa ponderado de $k > 0,7$. Entre as sessões de calibragem foram utilizados períodos de sete dias.

3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUANTITATIVA

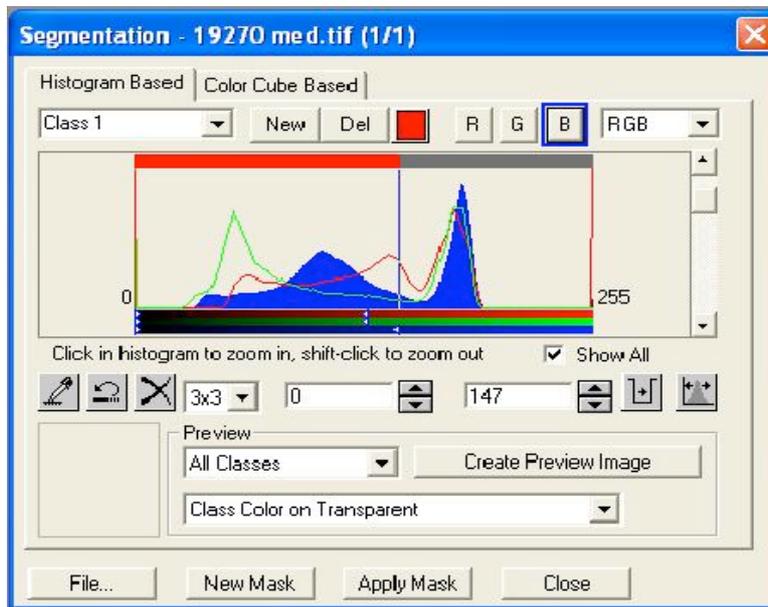
A análise histológica quantitativa foi realizada por um examinador, que capturou imagens em uma câmara de vídeo modelo Q-Color5™ (Olympus America, Inc., Center Valley, PA, USA) acoplada a um microscópio binocular modelo CX41RF (Olympus Latin America, Inc., Miami, FL, USA) e a um computador modelo Dimension 5150 (Dell Inc., Eldorado do Sul, RS, Brasil), utilizando o software Image-Pro Plus, versão 5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland, USA). De cada lâmina histológica corada por HE foram capturados campos microscópicos em um aumento de 400 X da extremidade esquerda para a direita de cada corte histológico. Os campos capturados foram separados para cada espécime em epitélio juncional, epitélio sulcular e epitélio bucal

A intensidade do infiltrado inflamatório foi mensurada por um examinador calibrado, com imagens que foram capturadas por meio do programa Image-Pro Plus 5.1. De cada lâmina histológica corada por HE campos microscópicos em um aumento de 400X foram capturados e divididos em três partes verticalmente de forma que formassem 3 zonas de avaliação para cada espécime, sendo uma em tecido conjuntivo adjacente ao epitélio interno, outra zona intermediária e outra em tecido conjuntivo adjacente ao epitélio bucal. Cada campo microscópico capturado recebeu um escore referente à intensidade de infiltrado inflamatório existente, de acordo com os seguintes critérios (Tagliavine *et al.*, 1980):

- Índice 0. Ausência de infiltrado – o número de células inflamatórias é insignificante em relação à população celular de fibroblastos.
- Índice 1. Infiltrado leve - o número de células inflamatórias é menor do que a população celular de fibroblastos.
- Índice 2. Infiltrado moderado - o número de células inflamatórias se equivale ao número de fibroblastos.
- Índice 3. Infiltrado intenso - o número de células inflamatórias é maior do que o número de fibroblastos.

A quantidade correspondente aos feixes de fibras colágenas adjacentes ao tecido epitelial foi avaliada em cortes histológicos corados com o tricrômico de Masson. O colágeno foi quantificado considerando-se três campos verticais, sendo um adjacente ao epitélio interno, um campo intermediário e um junto ao epitélio bucal. Campos microscópicos em um aumento de 100 X de cada corte histológico foram capturados por meio do programa Image-Pro Plus, versão 5.1. O software foi configurado para quantificar o total de pixels por campo e o total de pixels da cor correspondente a coloração dos feixes de fibras colágenas. Para identificação das cores dos feixes de fibras colágenas, foi utilizado um histograma com a cor azul, demonstrado na figura 2. Ao final foi calculada a área média de tecido conjuntivo adjacente a cada porção do epitélio.

Figura 2 – Histograma utilizado no Software Image-Pro Plus para identificação da cor dos feixes de fibras colágenas.



3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos pela análise histológica quantitativa foram expressos através de números absolutos, médias e desvio-padrão. A comparação estatística entre as medidas de área e lineares dos tecidos gengivais dos diferentes grupos experimentais foi realizada através do teste ANOVA, com 5% de significância. A significância estatística foi corrigida para múltiplas comparações usando o método de Bonferroni.

4 RESULTADOS

No grupo 2 onde foi administrado nifedipina 50mg/kg/dia e grupo 3, onde periodontite foi induzida e associada ao uso de solução salina, foi observado nos cortes histológicos a presença de 100% de cristas epiteliais. Foi relatado que no grupo 1, onde somente solução salina foi administrada, somente 40% das peças apresentavam a presença de alterações. No grupo 4, o qual foi submetido a periodontite induzida por ligadura associada ao uso de nifedipina 50mg/kg/dia a presença de alterações epiteliais foi de 80%, indicado na tabela 2. A comparação estatística entre os grupos não obteve um resultado com significância ($p < 0.05$).

Tabela 2 – Percentual de lâminas que apresentavam cristas epiteliais nos cortes histológicos avaliados nos diferentes grupos experimentais.

Presença de Cristas Epiteliais			Grupo				Total
			1A	2A	3A	4A	
Cristas Epiteliais	Presente	Número de Lâminas	2	5	5	4	16
		Porcentagem do Grupo	40,0%	100,0%	100,0%	80,0%	80,0%
	Ausente	Número de Lâminas	3	0	0	1	4
		Porcentagem do Grupo	60,0%	0%	0%	20,0%	20,0%
Total da Amostra		Número de Lâminas	5	5	5	5	20
		Porcentagem do Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.05$)

A ocorrência de ceratina foi relatada com 80% de presença no grupo 1 onde foi administrado solução salina, grupo 3 e 4, onde foi induzida periodontite e administrada solução salina (grupo 3) e nifedipina 50mg/kg/dia (grupo 4) respectivamente. No grupo 2, no qual foi administrado nifedipina 50mg/kg/dia, foi relatado 60% de presença de ceratina nos cortes histológicos, como mostra a tabela 3. A análise estatística comparando a presença ou ausência de ceratina entre os grupos da amostra teve um resultado não significativo ($p < 0.05$).

Tabela 3 – Percentual de lâminas que apresentavam ceratina nos cortes histológicos avaliados nos diferentes grupos experimentais.

Presença de Ceratina			Grupo				Total
			1A	2A	3A	4A	
Ceratina Presente	Número de Lâminas		4	3	4	4	15
	Porcentagem do Grupo		80,0%	60,0%	80,0%	80,0%	75,0%
Ausente	Número de Lâminas		1	2	1	1	5
	Porcentagem do Grupo		20,0%	40,0%	20,0%	20,0%	25,0%
Total da Amostra	Número de Lâminas		5	5	5	5	20
	Porcentagem do Grupo		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.05$)

Em todos os cortes histológicos pertencentes aos quatro grupos da amostra foram registradas as ocorrências de degeneração hidrópica e espaços intercelulares.

Quanto à disposição dos feixes de fibras colágenas, no grupo 1 considerado controle, 60% das fibras se encontravam perpendiculares e 40% paralelas. Relativo ao grupo 2 também considerado controle com administração de nifedipina 50mg/kg/dia, foi observada a ocorrência de 80% de fibras perpendiculares e 20% de fibras paralelas. No grupo 3 onde foi induzida a periodontite associada a administração de solução salina todos os cortes histológicos apresentavam os feixes de fibras colágenas desorganizados. O grupo 4 onde os ratos foram submetidos a periodontite induzida associada ao uso de nifedipina 50mg/kg/dia, apresentou 60% das fibras desorganizadas e 40% das fibras perpendiculares, resultados encontrados na tabela 4. Foi realizada análise estatística entre os grupos e o resultado obtido apresentou diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 4 – Percentual de lâminas nos quais os cortes histológicos avaliados, nos diferentes grupos experimentais, apresentavam a orientação dos feixes de fibras perpendiculares, paralelas ou de forma desorganizada em relação ao epitélio.

Orientação dos feixes de fibras colágenas			Grupo				Total
			1A	2A	3B	4C	
Orientação Fibras Colágenas	Perpendiculares	Número de Lâminas	3	4	0	2	9
		Porcentagem do Grupo	60,0%	80,0%	0%	40,0%	45,0%
	Paralelas	Número de Lâminas	2	1	0	0	3
		Porcentagem do Grupo	40,0%	20,0%	0%	0%	15,0%
	Desorganizadas	Número de Lâminas	0	0	5	3	8
		Porcentagem do Grupo	0%	0%	100,0%	60,0%	40,0%
Total da Amostra		Número de Lâminas	5	5	5	5	20
		Porcentagem do Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Letras maiúsculas diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p < 0.05$)

Quanto a intensidade do infiltrado inflamatório, foi observada 80% Leve e 20% Ausente no grupo 1 onde foi administrada solução salina e no grupo dois onde foi administrada nifedipina 50mg/kg/dia. No grupo 3, que foi submetido a periodontite induzida, foi relatada intensidade do infiltrado inflamatório 80% Leve e 20% Moderada. No grupo 4, o qual foi associado nifedipina 50mg/kg/dia a periodontite induzida, foi registrado 60% Moderado e 40% Leve. Foi realizada uma análise estatística entre os grupos e os resultados não obtiveram significância ($p < 0.05$). Não há diferença na intensidade do infiltrado inflamatório na ausência de periodontite induzida, como mostra a tabela 5. Contudo na presença de periodontite induzida e nifedipina há uma maior intensidade do infiltrado inflamatório, no entanto essa diferença não se mostrou com significância estatística.

Tabela 5 – Percentual de lâminas que nos cortes histológicos avaliados, nos diferentes grupos experimentais, apresentavam infiltrado inflamatório avaliado como leve, moderado, ou ausente.

Intensidade do infiltrado inflamatório			Grupo				Total
			1A	2A	3A	4A	
Intensidade Infiltrado Inflamatório	Ausente	Número de Lâminas	1	1	0	0	2
		Porcentagem do Grupo	20,0%	20,0%	0%	0%	10,0%
	Leve	Número de Lâminas	4	4	4	2	14
		Porcentagem do Grupo	80,0%	80,0%	80,0%	40,0%	70,0%
	Moderado	Número de Lâminas	0	0	1	3	4
		Porcentagem do Grupo	0%	0%	20,0%	60,0%	20,0%
Total da Amostra	Número de Lâminas	5	5	5	5	20	
	Porcentagem do Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$)

Os cortes histológicos corados com tricrômico de Masson utilizados para quantificar a área de fibras colágenas apresentaram como resultado uma diferença significativa ($p < 0.05$) entre suas médias de área, de acordo com cada grupo. Os grupos 1 e 2 não apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$) entre si, assim como os grupos 3 e 4 também não apresentaram diferença com significância ($p < 0.05$), resultados presentes na tabela 6.

Tabela 6 – Medidas de área em pixels quadrados de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio, nas lâminas coradas com tricrômico de Masson.

Grupos:	Média	Desvio Padrão
1 – Sol. Salina	0,0457A	0,01175
2 – Nifedipina 50	0,0443A	0,01170
3 – Lig + Sol. Salina	0,1085B	0,02127
4 – Lig + Nifedipina	0,0952B	0,03839

*Letras maiúsculas diferentes indicam significância estatística entre os grupos ($p < 0.05$)

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da nifedipina em situação de saúde e periodontite sobre a morfologia do epitélio, intensidade do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente e analisar a disposição dos feixes de fibras colágenas assim como quantificar a área de tecido conjuntivo adjacente. Quanto a análise histológica qualitativa, como realizamos a descrição dos tecidos em estudo considerando ausência e presença de estruturas, foram utilizados resultados expressos em porcentagens possibilitando assim uma quantificação dos resultados para realizar a análise estatística.

Foi observado que os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa relativo a presença de cristas epiteliais, contudo o grupo 1, que foi submetido somente a administração de solução salina, foi o que apresentou menor ocorrência de cristas epiteliais. Já os outros grupos que apresentavam o modelo de periodontite induzida somente, ou administração de nifedipina 50mg/kg/dia somente ou os dois associados, apresentaram uma ocorrência maior de alterações epiteliais, semelhante ao relatado em outros estudos como Moriaski, Kato *et al.*, 1993; Fu, Nieh *et al.*, 1997 e Fernandes, Gaio *et al.*, 2010.

Os achados relativos à presença de ceratina também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, embora se observasse que o único grupo a ser diferente dos outros foi o grupo que recebeu nifedipina 50mg/kg/dia, que apresentou menor presença de ceratina (60%) comparado aos outros grupos (80%). Achados que demonstram não haver uma influência direta da nifedipina sobre a camada ceratina do epitélio.

Todos os grupos apresentaram a presença de degeneração hidrópica e espaços intercelulares, mostrando haver uma alteração epitelial mesmo no grupo em que nenhuma medicação foi utilizada.

Os feixes de fibras colágenas se apresentaram distribuídos em sua maioria de forma desorganizada nos grupos 3 onde foi induzida periodontite e grupo 4 onde foi induzida periodontite e administrada nifedipina 50mg/kg/dia. Enquanto que nos grupos sem a indução de doença periodontal, grupos 1 e 2 os feixes de fibras se mostravam perpendiculares na sua maioria, com uma pequena ocorrência de feixes paralelos. Os grupos 1 e 2 se mostraram semelhantes estatisticamente, e foram considerados diferentes estatisticamente do grupo 3 e 4 que apresentaram diferença

estatisticamente significativa entre si. Resultados que entram em concordância com estudos como o de Zhang, Miao-Miao *et al.*, 2008. Resultados que sugerem que a periodontite induzida somente resulta em uma desorganização dos feixes de fibras do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio. E a desorganização dos feixes de fibras colágenas no grupo onde foi induzida periodontite e administrada nifedipina 50mg/kg/dia, foi menor provavelmente devido ao aumento de volume gengival causado pelo uso medicamento.

Para a análise histológica quantitativa foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório, utilizando-se dos mesmos critérios de Tagliavine *et al.*, 1980. Nos grupos 1 e 2 onde foi administrada solução salina e nifedipina 50mg/kg/dia foi relatado predomínio de infiltrado inflamatório leve. O grupo 3 que foi submetido a indução de periodontite associado ao uso de solução salina apresentou uma maior ocorrência de infiltrado inflamatório leve contudo com pequena ocorrência de infiltrado inflamatório moderado. Assim como o grupo 4 que possuía periodontite induzida associada ao uso de nifedipina 50mg/kg/dia apresentou uma predominância de infiltrado inflamatório moderado e ocorrência de infiltrado inflamatório leve. Apesar da diferença entre os grupos não ser estatisticamente significativa, os resultados mostram que com a presença de periodontite induzida e nifedipina há uma maior intensidade no infiltrado inflamatório. Resultados que entram em acordo com outros estudos como Moriaski, Kato *et al.*, 1993; Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996; Fu, Nieh *et al.*, 1997 e Spolidorio, Spolidorio *et al.*, 2002.

A avaliação da área de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio mostrou ser semelhante estatisticamente entre os grupos 1 e 2, assim como os grupos 3 e 4, teste e controle respectivamente. Contudo, houve diferença estatisticamente significativa quando se realiza a comparação entre os grupos teste e controle, ou seja na presença de periodontite induzida há uma porção maior de tecido conjuntivo adjacente, tanto na ausência como na presença de nifedipina. Resultados esses que discordam daqueles observados no estudo de Fernandes, Gaio *et al.*, (2010), provavelmente essa diferença está associada à unidade de medida utilizada, porque nesse estudo a avaliação da área foi realizada em pixels enquanto no outro em micrômetros.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que em todos os cortes histológicos avaliados nos diferentes grupos houve alterações epiteliais, no entanto essas alterações não mostraram significância estatística. Quando as alterações do tecido conjuntivo foram avaliadas, observou-se uma diferença na área de tecido conjuntivo entre os grupos teste e controle, associada principalmente com a indução da periodontite. No entanto não foram observadas alterações associadas a administração da nifedipina, o que pode estar associado a unidade de medida utilizada. Em relação a posição das fibras colágenas foi observado que a periodontite induzida causa uma desorganização dos feixes de fibras, e quando associada a nifedipina, esta desorganização se mostrou menor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WANNMACHER, L., Doenças e medicamentos que influem na prática odontológica. In. WANNMACHER, L., FERREIRA M.B.C. **Farmacologia Clínica para Dentistas**. 3.ed, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p. 489, 2007.
- LEDERMAN, D., H LUMERMAN, et al. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.57, n.6, Jun, p. 620-2, 1984.
- NISHIKAWA, S., T. NAGATA, *et al.* Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. **J Periodontol**, v.67, n.5, May, p.463-71. 1996.
- MORISAKI, I., KATO, *et al.* Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats. **J Periodontal Res**, v.28, n.6 Pt 1, Nov, p.396-403. 1993.
- SPOILDORIO, L.C., D. M. SPOLIDORIO, *et al.* Morphological evaluation of combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats. **J Periodontal Res**, v.37, n.3, Jun, p.192-5. 2002.
- FU, E., S. NIEH, *et al.* The effect of plaque retention on cyclosporine-induced gingival overgrowth in rats. **J Periodontol**, v.68, n.1, Jan, p.92-8. 1997.
- ISHIDA, H., T. KONDOH, *et al.* Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. **J Periodontol**, v.66, n.5, May, p.345-50. 1995.
- BULTHUIS, H. M., D. S. BARENDREGT, *et al.* Probe penetration in relation to the connective tissue attachment level: influence of tine shape and probing force. **J Clin Periodontol**, v.25, n.5, May, p.417-23. 1998.
- GARNICK, J. J., L. SILVERSTEIN. Periodontal probing: Probe tip diameter. **J Periodontol**, v.71, n.1, Jan, p.96-103. 2000. doi:10.1902/jop.2000.71.1.96

GONÇALVES, P. F., R. NOGUEIRA FILHO, *et al.* Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis—a study in rats. **Pesqui Odontol Bras**, v.17, n.1, Jan-Mar, p.46-50. 2003.

FERNANDES MI, *et al.* Effect of nifedipine on gingival enlargement and periodontal breakdown in ligature-induced periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**. 2010. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.05.003

ZHANG MM, FENG DF, SHAO P, SUN TT, WANG L, YANG BF. Nifedipine regulated periodontal ligament remodeling: An experimental study in rats. **Acta Odontol Scand**. 2008;66(6):327-33.

FRIEDEWALD VE, KORNMAN KS, BECK JD, GENCO R, GOLDFINE A, LIBBY P, *et al.* The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease (diamond). **J Periodontol** 2009;80:1021–32.

CAVAGNI, J., A. C. SOLETTI, *et al.* The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Pesqui Odontol Bras**, v.19, n.4, Dec, p.290-294. 2005.

ANNA-MORSE, M. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J Dent Res** v.24, p.143-53. 1945.

MOURE, S. P. Avaliação do tecido conjuntivo de folículos pericoronários, cistos dentígeros e tumores odontogênicos ceratocísticos. Mestrado em Patologia, 43 f. : 2007.