

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DOUTORADO
CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**ESTUDOS DA AÇÃO DA NIFEDIPINA SOBRE O ESTADO
PERIODONTAL DE RATOS**

Marilene Issa Fernandes

Prof. Orientador:

Dr. Pantelis Varvaki Rados

Prof. Co-Orientador:

Dr. Rui Vicente Oppermann

Porto Alegre, outubro 2006

“...nenhum poder, um pouco de saber, um pouco de sabedoria e o máximo de
sabor...” roland barthes

Ao meu amor **Jorge**, pela tua presença e
cumplicidade em todos os momentos.

Aos meus filhos, **Geórgia e Carlo**, pelo amor e
alegria de viver.

Quero **agradecer**, de coração, a todas as pessoas que participaram desta jornada, contribuindo para a concretização deste trabalho e me presenteando com energia, carinho, amizade e sabedoria.

A minha **Mãe**, Saide, pelo exemplo de garra e liderança,
e ao meu **Pai**, Hamilton, pelo apoio.

Aos meus **Irmãos**, Neca e Hamilton,
que me acompanham e vibram com minhas conquistas.

A minha irmã, e colega **Marisa**, que sempre me apoiou
na busca de meus ideais.

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**,
meu mestre e amigo, que desde sempre me ensina os caminhos da patologia,
obrigado pelo apoio incondicional.

Ao meu amigo de sempre, **Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann**, meu mestre de
plantão, mais uma vez meu agradecimento por todos os momentos que pude
compartilhar o teu saber.

Duda, sem teu trabalho incansável esta jornada seria bem mais difícil. Meu muito
obrigado por todas as ajudas, em todos os dias, com chuva ou com sol, com praia ou
com festa. Não tenho palavras, os ratos que o digam!

Ao **Cassiano**, pela atenção e grande auxílio na parte experimental, me ensinando as
lides com os ratos.

Ao **Susin**, que pegou o bonde andando, mas em tempo para me orientar nos
caminhos da estatística.

Aos Professores, **Dr. João Jorge Diniz Barbachan, Dr. Manoel Sant'Ana Filho, Dr. Onofre Francisco Quadros e Dra. Anna Chaves**, pelos ensinamentos.

Aos meus colegas, **Simone, Márcia, e João Batista**, pelo convívio ao longo do curso, e principalmente a **Bere**, pela amizade, carinho e companheirismo em todos os dias desta batalha

À **Isabel da Silva Lauxen**, pelo apoio no laboratório de patologia.

Ao **Zeca**, pelo auxílio imediato com o português.

À **Gê**, que soube entender a importância deste trabalho para mim, me ajudando com os ratos.

A todos os colegas da perío, **Patrícia, Alex e Carlos Heitor**, obrigado pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos **Fernando e Alessandra**, que me acompanharam durante todo esse trabalho.

À **Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul** pela utilização do biotério.

À **Edinete**, que todas as manhãs me acordou com seu café.

À **Susi e Adriana**, que se empenharam em todos os momentos desta jornada, me auxiliando no que fosse preciso.

A todos os **Mestres** que participaram desta caminhada.

SUMÁRIO

Introdução	
• A ação da nifedipina sobre o estado periodontal	6
• Considerações metodológicas	10
Objetivo geral	
• Objetivos metodológicos	12
• Objetivos experimentais	12
Estudos metodológicos	
• ANÁLISE COMPARATIVA DA ALTURA ÓSSEA HISTOMÉTRICA E MORFOMÉTRICA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATO	13
• AVALIAÇÃO QUALITATIVA MICROSCÓPICA DO TEMPO DE FIXAÇÃO E MEIO DE DESCALCIFICAÇÃO DO PERIODONTO EM MAXILA DE RATOS	18
Estudo experimental	
• AÇÃO DA NIFEDIPINA SOBRE O ESTADO PERIODONTAL DE RATOS WISTAR	25
Estudos metodológicos	
• Discussão	40
Estudos experimentais	
• Discussão	45
Referências bibliográficas	49
Artigo I	54
• COMPARAÇÃO DA ALTURA ÓSSEA HISTOMÉTRICA E MORFOMÉTRICA EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA (Aceito para publicação no Brazilian Oral Research)	
Artigo II	67
• AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA QUALITATIVA DO TEMPO DE FIXAÇÃO E MEIOS DE DESCALCIFICAÇÃO DO PERIODONTO DE RATOS (Aceito para publicação no Brazilian Oral Research)	
Artigo III	83
• AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NIFEDIPINA SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS DE RATOS WISTAR	

INTRODUÇÃO

A ação da nifedipina sobre o estado periodontal

A nifedipina pode apresentar como efeito colateral um aumento de volume gengival relatado pioneiramente por Lederman, Lumerman *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.

A prevalência dos aumentos de volume gengival é bastante variável. Barak, Engelberg *et al.* (1987) relataram que 14,7% dos pacientes usuários de nifedipina desenvolveram hiperplasia gengival clínica, enquanto Slavin e Taylor (1987), mostraram que 51% de 55 indivíduos sob terapia com nifedipina, desenvolveram aumento de volume gengival. Resultados semelhantes foram encontrados por Nery, Edson *et al.* (1995). No entanto, outros relatos mostram prevalências variáveis, chegando até 83% (Fattore, Stablein *et al.*, 1991; Barclay, Thomason *et al.*, 1992; Ellis, Seymour *et al.*, 1999).

A nifedipina é um bloqueador de canais de cálcio que age inibindo o influxo de íons cálcio pela membrana das células da musculatura lisa de vasos e do coração, sem alterar as concentrações de cálcio no soro. Promove uma vasodilatação prolongada das artérias coronarianas, aumentando o suplemento de oxigênio e inibindo o processo de contração muscular (Butler, Kalkwarf *et al.*, 1987). O processo de contração do músculo cardíaco e musculatura lisa vascular são dependentes do movimento dos íons cálcio extracelulares para dentro dessas células através de canais específicos (Henry, 1980). A nifedipina é um bloqueador de canais de cálcio de alta especificidade utilizado para o tratamento das desordens cardiovasculares tais como: angina pectoris, arritmias ventriculares e hipertensão.

As manifestações clínicas dos aumentos de volume gengival usualmente se apresentam entre um e três meses após o início do tratamento com a droga. Inicia nos espaços interproximais e caracteriza-se por um aumento na região vestibular dos

dentos anteriores confinados a gengiva inserida. Podem se estender coronariamente e interferir com a estética e mastigação (Hallmon e Rossmann, 1999).

Um modelo experimental em ratos, com a administração de drogas como a nifedipina, induziu a um 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. Tratamentos longos não resultam em maior aumento de volume gengival. A avaliação histológica mostrou um severo infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais de ratos infectados (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996).

As alterações do tecido epitelial gengival associado com nifedipina mostraram uma marcada hiperplasia com longas cristas epiteliais no epitélio sulcular, sem alterações no epitélio juncional, vistas tanto em estudos animais quanto em humanos (Barak, Engelberg *et al.*, 1987; Morisaki, Kato *et al.*, 1993). Também o tecido conjuntivo, em ratos, apresenta densa substância intercelular fibrosa associada a um infiltrado inflamatório na porção subepitelial (Morisaki, Kato *et al.*, 1993). As alterações epiteliais e conjuntivas se mostraram mais relacionadas com a severidade do aumento de volume gengival do que com o uso de nifedipina (Spolidorio, Spolidorio *et al.*, 2002).

Os mecanismos associados com aumento de volume gengival que melhor explicam sua ocorrência e distribuição apontam para um modelo multifatorial.

Considerando o sexo, os homens teriam três vezes mais chance do que as mulheres de desenvolver um aumento de volume significativo (Ellis, Seymour *et al.*, 1999). Estudos em animais também observaram que ratos machos são mais propensos a um aumento de volume gengival que ratas (Ishida, Kondoh *et al.*, 1995; Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996).

A idade se mostrou inversamente associada com o aumento de volume. Quanto mais jovem, maior o aumento de volume gengival observado (Nakou, Kamma *et al.*, 1998). Em relação à dose de nifedipina, Barclay, Thomason *et al.* (1992) em um estudo com 19 pacientes, utilizando a medicação há pelo menos seis meses, e Nery, Edson *et al.* (1995), em um estudo com 181 pacientes, sob medicação há no

mínimo quatro meses, não encontraram relação significativa. Por outro lado, Nishikawa, Nagata *et al.* (1996) acreditaram ser a dosagem diária da droga o aspecto etiopatológico mais importante do aumento de volume gengival em ratos. Ishida, Kondoh *et al.* (1995) concordaram com esses achados observando não haver uma concentração da droga no soro que seja um gatilho para os aumentos de volume gengival.

A concentração máxima de nifedipina no fluido gengival é 84 vezes maior que no plasma. Sua presença no fluido crevicular gengival está diretamente relacionada com a extensão da inflamação gengival (Ellis, Seymour *et al.*, 1992). Mostrando ser a inflamação gengival um importante co-fator para a expressão do aumento de volume gengival (Ellis, Seymour *et al.*, 1999). Em contrapartida, no estudo de Thomason, Ellis *et al.* (1997), considerando as variáveis farmacológicas da nifedipina, somente a concentração no plasma foi identificada como um fator de risco associado com a severidade do aumento de volume gengival. Assim, a redução da concentração de nifedipina no plasma pode atenuar a manifestação clínica do aumento de volume gengival.

A presença do biofilme é também reconhecida pelo sistema de classificação das doenças periodontais como um co-fator associado à etiologia dos aumentos de volume gengival (Fu, Nieh *et al.*, 1997), estando classificada como doenças gengivais induzidas por placa e modificadas por medicações (Armitage, 1999). No entanto, a presença do biofilme e inflamação gengival por si só não explicam esta condição. Morisaki, 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 com nifedipina, achados esses que concordam com o estudo de Ishida, Kondoh *et al.* (1995). Nesses 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 isso, cabe lembrar o diminuto tamanho da união dento-gengival de ratos.

A influência da nifedipina sobre a evolução da periodontite em ratos foi avaliada. 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 foi utilizada considerando os critérios atuais de diagnóstico e pesquisa em periodontia. Pois a sistemática usual de 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 ósseo principalmente na ausência de um cegamento do examinador.

Desta forma, considerando a necessidade da determinação de descritores da doença associados tanto com a etiologia como com a situação inflamatória e de destruição dos tecidos periodontais, se faz necessário reavaliar os aumentos de volume gengival de forma sistemática, de acordo com padrões atuais de diagnóstico. Assim, estudos que estabeleçam qual a repercussão clínica e histopatológica da nifedipina em situação de saúde e periodontite devem ser realizados de forma a permitir uma avaliação do processo saúde/doença baseados em conceitos que descrevam claramente essas alterações.

Considerações metodológicas

Os estudos experimentais em ratos podem representar grandes auxílios para a pesquisa, já que é possível induzir doenças e avaliar diferentes aspectos das condições sistêmicas dos animais. Achados clínicos e histopatológicos da doença

periodontal em ratos apresentam muitas semelhanças em relação ao que é visto em seres humanos. Podem ser criados em condições livres de germes e facilmente se induz imunodeficiências nos mesmos, além das semelhanças morfológicas, microbiológicas e imunológicas (Klausen, 1991).

Johnson (1975) observou, com a utilização de ligaduras de seda para induzir periodontite, um achatamento e deslocamento da crista gengival, acúmulo de depósitos, aumento da proliferação de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente e migração do epitélio juncional apicalmente. Reabsorções da crista óssea alveolar ocorreram após 17 dias da colocação de ligaduras nos ratos. Sallay, Sanavi *et al.* (1982), observaram que a destruição óssea vista em ratos com ligadura tem origem bacteriana, e a supressão das defesas locais facilita tal destruição.

A literatura que relata os estudos de doença periodontal em animais não apresenta uma padronização no que se refere ao processamento histológico como o tempo de fixação, descalcificação e tipo de substância descalcificadora utilizada. O tempo de fixação das peças histológicas é variável e não se apresentam critérios de avaliação pré-determinados na relação entre os métodos de fixação com a descalcificação. Nishikawa, Nagata *et al.* (1996) utilizaram a formalina neutra a 10% durante 48 horas em ratos de 20 dias de vida, não informando qual o método de descalcificação utilizado. Chiu, Fu *et al.* (2001) utilizaram a formalina a 10% e o ácido clorídrico a 5% para descalcificação não determinando os períodos. Shimizu, Kataoka *et al.*, 2002 não informaram nem o período de fixação nem qual o descalcificador utilizado.

É importante ressaltar que o tempo de fixação e o agente descalcificador utilizado têm relevância para a qualidade dos preparos histológicos e, conseqüentemente, na precisão da análise dos resultados das pesquisas. É necessário que o processo de preparo das lâminas, também, seja eficiente, sem perda de qualidade do resultado final.

Tradicionalmente, a avaliação histológica representa o padrão na maioria dos trabalhos. Susin e Rösing (2003), estudaram em ratos Wistar a altura óssea histologicamente de forma linear, considerando o espaço interproximal de primeiros e

segundos molares, medindo da JAC até o ponto mais apical da crista óssea. Já nos estudos de Nociti, Nogueira-Filho *et al.* (2000) e Nogueira-Filho, Froes Neto *et al.* (2004) a forma de avaliar histologicamente correspondeu a uma área (mm^2) de perda óssea na região da furca dos primeiros molares de ratos Wistar.

Mais recentemente, outras formas de avaliar perda óssea estão sendo empregadas. Rivaldo, Padilha *et al.* (2005) em um modelo de estudo em ratos *Mus domesticus*, avaliaram as alterações da altura óssea em mandíbulas descarnadas, na área (mm^2) correspondente à perda óssea no primeiro e segundo molares. A área de perda óssea foi definida considerando: mesialmente, uma linha da junção cimento-esmalte até a altura óssea na raiz mesial do primeiro molar; e distalmente, por uma linha da junção cimento-esmalte até a crista óssea na raiz distal do segundo molar; coronariamente correspondia à porção mais apical da junção cimento-esmalte e apicalmente à posição mais apical da crista óssea. Por outro lado, Kuhr, Popa-Wagner *et al.* (2004), avaliaram em ratos a perda óssea induzida, considerando dois diferentes métodos em mandíbulas descarnadas: em um a distância da junção amelo-cementária até a crista óssea foi medida linearmente em diferentes sítios; noutro, a área de superfície radicular exposta foi medida. O estudo conclui que o método de medir a distancia linearmente deve ser preferido ao método de avaliação da área.

Na avaliação histométrica o plano de corte pode eventualmente não corresponder à zona de maior perda óssea, enquanto na avaliação morfométrica o ponto com maior perda óssea em maxilas ou mandíbulas descarnadas pode ser visualizado.

Considerando que não está estabelecida na literatura qual a melhor forma de avaliar os tecidos periodontais e considerando que houve uma nova sistematização para o diagnóstico do processo saúde/doença periodontal, a metodologia de avaliação para os tecidos periodontais em estudos animais necessita ser reavaliada.

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da nifedipina sobre os tecidos gengivais e periodontais de ratos em situação de saúde periodontal e periodontite.

Objetivos metodológicos

1. Comparar o procedimento de medição da altura óssea, em periodonto saudável e com periodontite, através de cortes histológicos e morfologicamente em osso seco.
2. Avaliar as características histológicas dos tecidos periodontais em maxila de ratos Wistar, comparando diferentes tempos de fixação associados a descalcificação das peças por ácido nítrico a 5% ou ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20%;

Objetivos experimentais

1. Avaliar as possíveis alterações histológicas sobre os tecidos epitelial, conjuntivo e infiltrado inflamatório decorrente da administração de nifedipina, em situação de saúde gengival;
2. Avaliar as possíveis alterações histológicas na relação entre junção amelo-cementária e crista óssea decorrente da administração de nifedipina, em situação de saúde gengival;
3. Avaliar as possíveis alterações histológicas sobre os tecidos epitelial, conjuntivo e infiltrado inflamatório decorrente da administração de nifedipina, em situação de periodontite;
4. Avaliar as possíveis alterações histológicas na relação entre junção amelo-cementária e crista óssea decorrente da administração de nifedipina, em situação de periodontite.

ESTUDOS METODOLÓGICOS

1. ANÁLISE COMPARATIVA DA ALTURA ÓSSEA HISTOMÉTRICA E MORFOMÉTRICA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS

METODOLOGIA

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos com 60 dias de vida, pesando entre 250 e 350 gramas. Os ratos permaneceram em caixa-moradia de plástico, com acesso a comida e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado no Instituto de Ciências Biomédicas da UFRGS. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Desenvolvimento do experimento

Anestesia geral foi obtida pela administração intramuscular da associação das drogas Hidrocloridrato de Ketamina /Cloridrato de Xilazina para possibilitar a colocação de ligadura (fio de sutura de algodão 3-0) com o objetivo de induzir perda óssea. As ligaduras foram colocadas no segundo molar superior esquerdo (lado teste), permanecendo durante 30 dias. Os dentes contra-laterais foram considerados controle (sem ligadura). A morte dos ratos ocorreu por deslocamento cervical. As maxilas foram removidas e divididas na sua linha média.

Processamento das peças e análise histológica

Dez hemimaxilas (lado teste e controle) foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após, as peças foram submetidas à descalcificação por solução de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%) durante 40 dias. As peças descalcificadas contendo somente os três molares, foram individualmente mergulhadas em bicarbonato de sódio para fins de neutralização e submetidas ao processamento histológico. As peças foram incluídas em parafina,

cada uma dando origem a três cortes, a cada 20 μ m, realizados em micrótomo^{*}, no sentido vestibulo-palatino de 3 μ m referentes ao segundo molar superior. Na seqüência, os cortes foram corados pela técnica de H/E.

Considerou-se como critério de inclusão para avaliação, lâminas com porção radicular, epitelial e crista óssea no mesmo corte. Imagens desses cortes foram capturadas por máquina digital[†]. Todos os cortes foram capturados com um aumento de 50 vezes. Para fins de conversão dos resultados de medição, foi fotografada uma escala microscópica calibradora[‡] de medida conhecida na mesma objetiva. Usando o sistema de análise de imagem[§], um examinador que desconhecia a que grupo pertencia a lâmina obteve 3 registros lineares da crista óssea à junção amelo-cementária (JAC), dos quais o de maior comprimento foi selecionado para análise dos resultados (Figura 1).

Processamento das peças e análise morfológica

Dez hemimaxilas (lado teste e controle) tiveram toda sua matéria orgânica removida após imersão em Hipoclorito de Sódio 8%^{**} durante 4 horas. As peças foram lavadas em água corrente e, imediatamente, secas com ar comprimido. A fim de delinear mais claramente a junção amelo-cementária (JAC) aplicou-se Azul de Metileno a 1% durante 1 minuto. Fotografias foram realizadas através de câmera digital^{††} acoplada em tripé, de modo que a máquina permanecesse paralela ao solo, com a distância focal mínima. As peças foram fixadas em cera nº 7 e mantidas com seu plano oclusal paralelo ao solo e seu longo eixo perpendicular à câmera. Foram tomadas fotografias das faces vestibulares e palatinas. Para fins de validação de conversão de medida, todas as peças foram fotografadas com o auxílio de régua

* RM2155 Ernst Leitz® - Germany

† Nikon® Coolpyx, 4 Megapixels

‡ E. Leitz® Wetzlar

§ IMAGETOOL®

** Qboa®

†† Nikon® D100, 6.1 Megapixels

milimetrada. Usando o sistema de análise de imagem^{‡‡}, um examinador desconhecedor da distribuição de grupos obteve 3 registros lineares da crista óssea a JAC, dos quais o de maior comprimento foi selecionado para análise (Figura 2)

Análise estatística

Média (\pm desvio-padrão) das distâncias entre a JAC e as cristas ósseas foram obtidas para os lados teste e controle tanto para as maxilas analisadas pelo método histométrico como pelo método morfométrico. Para a análise intra-grupo (morfométrico ou histométrico), as medições dos lados ligadura e sem ligadura foram comparadas pelo teste t para amostras pareadas. Para a análise entre os grupos (morfometria x histologia), os lados teste e controle foram comparados pelo teste t para amostras independentes. O nível alfa estabelecido para o presente estudo foi de 0,05.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão demonstrados no Gráfico 1 e na Tabela 1. Observa-se que em todas as áreas avaliadas (vestibulares e palatinas), tanto através da análise histométrica quanto pela análise morfométrica, a presença de ligaduras gerou maior perda óssea alveolar (diferenças estatisticamente significativas, teste t pareado, $p < 0,05$).

A tabela 1 compara os métodos histométrico e morfométrico. Observa-se que, nas áreas palatinas dos dentes com ou sem ligadura e nas vestibulares dos dentes com ligadura, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os métodos (teste t pareado para amostras independentes, $p > 0,05$). Entretanto, verificou-se uma média (\pm desvio padrão) de 0,23 (\pm 0,08) para as áreas vestibulares dos dentes sem ligadura através da histometria, resultado estatisticamente diferente da média obtida nas áreas correspondentes para o método morfométrico (0,41 \pm 0,10).

^{‡‡} IMAGETOOL®



Figura 1 – Análise histológica - registros lineares da crista óssea até a junção amelo-cementária em vestibular.(H/E 100X).



Figura 2 – Análise morfométrica - registros lineares da crista óssea até a junção amelo-cementária na face vestibular em maxila descarnada (coloração azul de metileno).

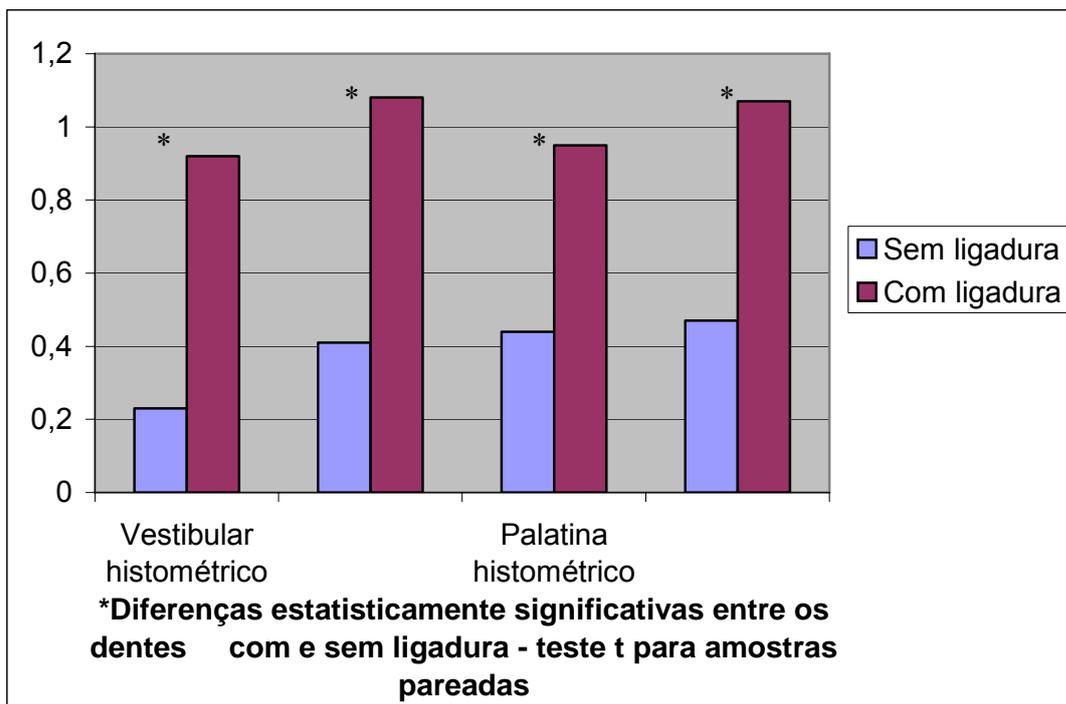


Gráfico 1 - Análise entre o método histológico e morfológico para faces vestibulares e palatinas, com e sem ligadura.

Tabela 1. Análise entre o método histológico e morfológico para as áreas vestibulares e palatinas com e sem ligadura.

	Vestibular com ligadura	Palatina com ligadura	Vestibular sem ligadura	Palatina sem ligadura
Histometria	0,92 ± 0,16	0,95 ± 0,25	0,23 ± 0,08*	0,44 ± 0,15
Morfometria	1,08 ± 0,35	1,07 ± 0,30	0,41 ± 0,10*	0,47 ± 0,11

* Diferença estatisticamente significativa $p < 0.05$.

2. AVALIAÇÃO QUALITATIVA MICROSCÓPICA DO TEMPO DE FIXAÇÃO E MEIO DE DESCALCIFICAÇÃO DO PERIODONTO EM MAXILA DE RATOS

METODOLOGIA

Foram utilizados 15 ratos Wistar machos com 60 dias de vida. Os mesmos foram mortos por deslocamento cervical, sendo que as maxilas foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% por 24, 48 e 72 horas. Cada maxila foi seccionada na linha média, de modo que uma hemi-maxila fosse descalcificada com ácido nítrico a 5% durante 7 dias e a outra em solução de Anna Morse durante 35 dias. O processo de descalcificação foi monitorado radiograficamente e por inspeção tátil, utilizando uma sonda exploradora. As peças descalcificadas foram individualmente submetidas ao processo de neutralização com bicarbonato de sódio e depois ao processamento histológico, que se constituiu de quatro banhos em álcool 95% (80 minutos cada), um banho em álcool absoluto (de 60 minutos), três banhos em xilol (80 minutos) e dois banhos em parafina líquida a 60°C (120 minutos cada), seqüencialmente para posterior inclusão em parafina. Para a inclusão foi observado que a face mesial do primeiro molar ficasse voltada para o plano de corte do bloco. Os cortes foram realizados em micrótomo^{§§}, com 3µ de espessura até alcançar planos de corte do segundo molar, avaliados por meio de lupa. Cada bloco deu origem a três cortes escolhidos entre os melhores, avaliados por meio de microscopia de luz, os quais deveriam possuir os seguintes critérios para inclusão no estudo: apresentar o dente com porção coronária e radicular, junção amelo-cementária evidente em pelo menos uma face, vestibular ou palatina e crista óssea passível de identificação. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e submetidos a desparafinização por dois banhos de xilol (10 minutos cada), desidratação por dois banhos de álcool absoluto (5 minutos cada), hidratação (1 minuto) e coloração por hematoxilina de Harris (2 minutos) e eosina (1 minuto) de forma seqüencial. Em seguida, a desidratação rápida, por meio de três banhos em

^{§§} RM2155 Ernst Leitz® - Germany

álcool absoluto (1 minuto cada) e diafanização (processo de clareamento) realizado com dois banhos de xilol (10 minutos cada), que garantem transparência ao material. A montagem das lâminas foi realizada pelo meio de inclusão^{†††} (Junqueira e Junqueira, 1985).

As lâminas foram examinadas por dois observadores treinados e cegos em relação ao tempo de fixação e tipo de descalcificação. A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio óptico^{‡‡‡} (aumento de 40 X), com o objetivo de avaliar: epitélio sulcular (íntegro ou rompido); deslocamento do cemento (ausente, terço cervical, terço médio/apical); desmineralização da dentina (adequada, ou inadequada e se coronária, cervical ou apical); desmineralização óssea (adequada ou inadequada). Para os tecidos mineralizados, dentina e osso, os cortes foram considerados adequados quando se apresentavam de forma uniforme e sem rompimento.

A mensuração da distância entre a junção amelo-cementária e a porção mais coronal da crista alveolar foi realizada capturando-se as imagens através de um microscópio de luz transmitida^{§§§}, acoplado a uma câmera de vídeo colorida^{****}, com as seguintes especificações: sistema de sinal NTSC standart, tamanho da imagem 1/3 polegada, resolução 479 linhas horizontais na TV, 380,00 pixels 771 (H) e 490 (V), sensor de imagem CCD que digitalizou as imagens para o programa de Sistema de Processamento e Análise de Imagens^{††††}, instalado em um computador.^{‡‡‡‡}

Análise Estatística

A análise estatística das características histológicas foi realizada por meio de teste ranqueado de Wilcoxon, considerando-se as variáveis descritas no item

^{†††}Entelan® Merk®¹⁰

^{‡‡‡} ZEISS®, Jena, Germany

^{§§§} ZEISS®, Jena, Germany

^{****} JVC® modelo TK – C 620

^{††††} IMAGELAB®

^{‡‡‡‡} UNISYS®

avaliação histológica. Para a análise da distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea utilizou-se o teste ANOVA ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

A avaliação linear da altura da crista óssea em relação à junção amelo-cementária, medida em pixels, mostrou que tanto para o ácido nítrico como para a solução de Anna Morse, nos diferentes tempos experimentais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, para $p \leq 0,05$, quando comparadas as faces vestibulares e palatinas (tabela 1).

A presença do cimento íntegro e ligado ao dente é de fundamental importância na determinação da altura óssea. A tabela 2 mostra a situação do cimento acelular após descalcificação com Ácido Nítrico e Ana Morse nos diferentes tempos de fixação em formalina 10%, mostrando ausência de deslocamento, em cervical ou na porção média e apical. Os menores índices de deslocamento aconteceram no período de fixação de 48 horas, principalmente quando a descalcificação foi por ácido Anna Morse. Nessas condições, 73,3 % das amostras não apresentaram deslocamento; enquanto, no mesmo tempo experimental, quando se usou ácido nítrico, somente 23,1% não apresentaram deslocamento.

A tabela 3 mostra o padrão de desmineralização da dentina em valores percentuais com ácido nítrico e Anna Morse nos diferentes tempos de fixação em formalina 10%. Considerando uma desmineralização adequada, uma desmineralização inadequada somente na porção coronária, simultaneamente na coronária e cervical e na coronária, cervical e apical. Os resultados mostraram situações variadas nos diferentes momentos experimentais para os diferentes descalcificadores, não obedecendo a um padrão. Para o ácido nítrico o melhor tempo foi 48 horas, onde 38,5 % das amostras foram consideradas adequadas. Já para a solução de Anna Morse o tempo de fixação não mostrou um padrão determinante.

A avaliação microscópica descritiva dos cortes histológicos mostrou uma melhor uniformidade na coloração e diferenciação na união do tecido epitelial e

conjuntivo quando se utilizou um período de fixação de 48 horas e descalcificação em solução de Anna Morse, bem como a preservação dos tecidos moles presentes na maxila. Nos tempos experimentais de 24 e 72 horas, tanto para ácido nítrico como para a solução de Anna Morse, os tecidos mostraram alterações tanto de preservação como de afinidade pela coloração de hematoxilina e eosina (Figura 1). Quando analisados os padrões de processamento das peças histológicas, pôde-se observar que os melhores resultados obtidos em relação à integridade do epitélio sulcular foram encontrados no período de fixação de 48 horas (Gráfico 1).

Quando analisado histologicamente o padrão de descalcificação do osso maxilar, pôde-se observar que as melhores condições de descalcificação foram as fixadas por 48 horas. O ácido nítrico, neste período, foi o que demonstrou os melhores resultados para a desmineralização (Gráfico 2).

Tabela 1. Valor médio, em pixels (desvio padrão) da medida entre a porção mais coronária da crista óssea e a junção amelo-cementária, comparando faces vestibulares e palatinas para os diferentes períodos de fixação e descalcificação com ácido nítrico e solução de Anna Morse.

Tempo de fixação	24 horas	48 horas	72 horas	P
Descalcificação				
Ácido nítrico				
Vestibular	205,99 (34,20)	210,95 (39,33)	176,59 (60,45)	0,496
Anna Morse				
Vestibular	205,21 (54,77)	200,77 (45,78)	186,12 (35,73)	0,794
Ácido nítrico				
Palatino	199,69 (38,34)	254,14 (66,50)	248,83 (38,71)	0,202
Anna Morse				
Palatino	231,39 (46,55)	268,69 (69,26)	298,55 (70, 82)	0,280

Tabela 2. Frequência percentual de deslocamento do cimento.

Tempo de fixação Deslocamento do cimento	24 horas		48 horas		72 horas	
	Ac. Nítrico / A. Morse		Ac. Nítrico / A. Morse		Ac. Nítrico / A. Morse	
Ausente	0	53,3	23,1	73,3	6,7	66,7
Terço cervical	40	13,3	38,5	6,7	33,3	13,3
Terço médio/apical	60	33,3	38,5	20	60	20
P	0,006		0,015		0,014	

Tabela 3 – Padrão de desmineralização da dentina (percentual) com ácido nítrico e Anna Morse nos diferentes tempos de fixação em formalina tamponada 10%.

Tempo de fixação Desmineralização da Dentina	24 horas		48 horas		72 horas	
	Ac. Nítrico/A. Morse		Ac. Nítrico/A. Morse		Ac. Nítrico/A. Morse	
Adequada	6,7	26,7	38,5	13,3	0	33,3
Inadequada coronária	33,3	20	23,1	40	6,7	6,7
Inadequada coronária/cervical	20	46,7	7,7	13,3	40	6,7
Inadequada coronária/cervical/apical	40	6,7	7,7	33,3	53,3	53,3
P	0,094		0,837		0,510	

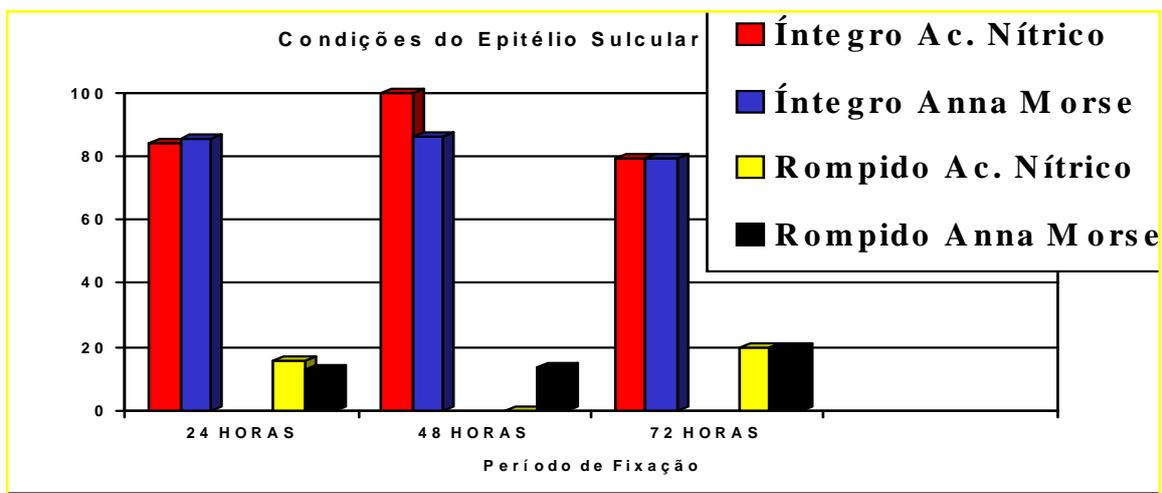


Gráfico 1 - Situação do epitélio sulcular, íntegro ou rompido, após descalcificação com Ácido Nítrico e Anna Morse nos diferentes tempos de fixação em formalina 10%.

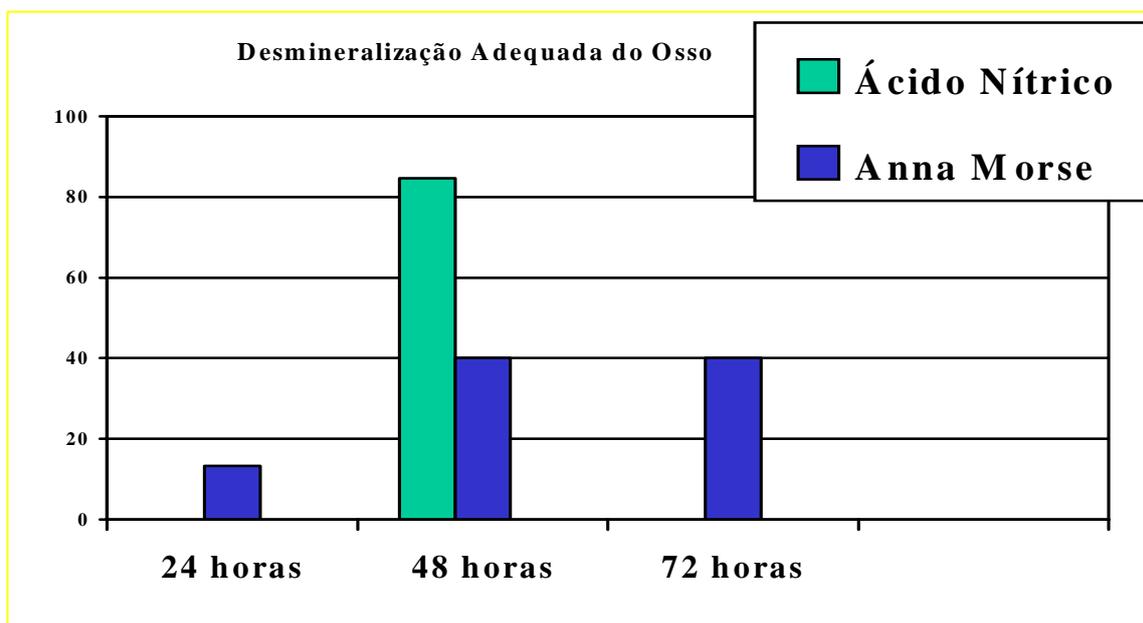


Gráfico 2 - Padrão de desmineralização óssea após descalcificação com Ácido Nítrico e Anna Morse nos diferentes tempos de fixação em formalina 10%.

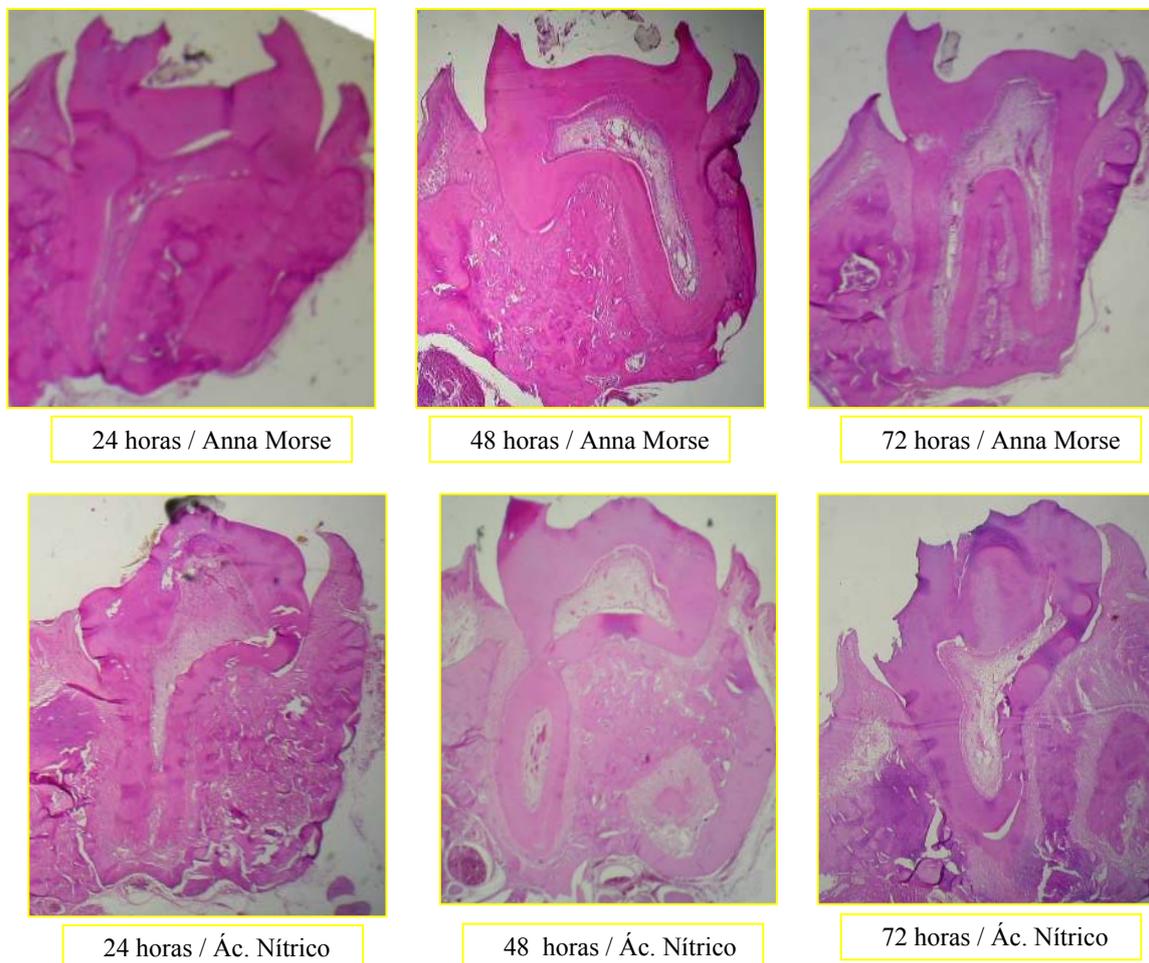


Figura 1 - Avaliação microscópica dos cortes histológicos mostrou melhor uniformidade na cor e diferenciação dos tecidos epitelial e conjuntivo com um período de fixação de 48 horas e descalcificação em solução de Anna Morse. Coloração hematoxilina e eosina (aumento 10X).

ESTUDO EXPERIMENTAL

AÇÃO DA NIFEDIPINA SOBRE O ESTADO PERIODONTAL DE RATOS WISTAR

METODOLOGIA

Descrição da amostra

Para a realização deste estudo, foram utilizados 50 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, peso variando entre 144 e 170g no momento experimental. Foram mantidos em caixas-moradia, confeccionadas em plexiglass, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem, dividida conforme os grupos experimentais no Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul. Os animais foram submetidos a ciclo claro/escuro (luzes acessas das 8:00 às 20:00 h).

Delineamento do estudo

Os animais foram divididos em grupos conforme segue:

- Grupo controle:

Dez ratos foram utilizados como controle, mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa), recebendo ração padronizada e água *ad libitum*. Durante o período experimental os ratos receberam diariamente 50ml/kg/dia de soro fisiológico via sonda gástrica^{§§§§}, ajustado para o peso semanalmente.

- Grupo controle com nifedipina 50mg/kg/dia:

Dez ratos submetidos nifedipina 50mg/kg/dia (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.*, 2003), via sonda gástrica, por trinta dias, sendo a dose ajustada semanalmente de acordo com o peso, recebendo ração padronizada, água *ad libitum*, e mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa).

- Grupo ligadura:

^{§§§§} BECTON DICKINSON - DB®, São Paulo, Brasil

Dez ratos foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005), e mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa), recebendo ração padronizada e água *ad libitum*. Durante o período experimental os ratos receberam 50ml/kg/dia de soro fisiológico via sonda gástrica, ajustado para o peso semanalmente.

- Grupo ligadura e nifedipina 50mg/kg/dia:

Dez ratos foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005), administrados nifedipina, 50mg/kg/dia (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.*, 2003), via sonda gástrica, por trinta dias, sendo a dose ajustada semanalmente de acordo com o peso, recebendo ração padronizada, água *ad libitum*, e mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa).

- Grupo ligadura e nifedipina 10mg/kg/dia:

Cinco ratos foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005), administrados nifedipina, 10mg/kg/dia (Chiu, Fu *et al.*, 2001), via sonda gástrica, por trinta dias, sendo a dose ajustada semanalmente de acordo com o peso, recebendo ração padronizada, água *ad libitum*, e mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa).

- Grupo ligadura e nifedipina 100mg/kg/dia:

Cinco ratos foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005), administrados nifedipina, 100mg/kg/dia (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996), via sonda gástrica, por trinta dias, sendo a dose ajustada semanalmente de acordo com o peso, recebendo ração padronizada, água *ad libitum*, e mantidos em duas caixas-moradia (cinco ratos por caixa).

Medicação sistêmica utilizada

A obtenção da nifedipina em forma líquida foi a partir do conteúdo de cápsulas, Adalat^{*****}, pelo método da tesoura. Desta forma, a ponta da cápsula foi cortada com uma tesoura cirúrgica e o conteúdo retirado comprimindo a cápsula com um porta agulhas (Rosen e Johnson, 1989). A nifedipina é sensível à luz, assim a remoção do conteúdo da cápsula foi realizada com proteção adequada, tanto durante o manuseio quanto para a armazenagem (Helin e Kontra, 2000).

Indução de doença periodontal

Os ratos do grupo ligadura e os do grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg foram submetidos à colocação de uma ligadura com fio de seda preta trançada⁺⁺⁺⁺ ao redor dos segundos molares superiores esquerdos, com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme subgingival e o estabelecimento de perda tecidual (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005).

A colocação da ligadura foi realizada sob anestesia geral. Os ratos dos quatro grupos experimentais, inclusive aqueles que não receberam ligadura, foram submetidos à anestesia geral pela administração intramuscular da associação (1:1) das drogas Hidrocloridrato de Ketamina⁺⁺⁺⁺ e Cloridrato de Xilazina^{§§§§}, na dose de 50mg/kg de peso corporal. Durante a anestesia, a fim de prevenir hipotermia, os ratos foram mantidos aquecidos, enrolando-os em papel alumínio e mantendo-os sob lâmpada de 60 watts.

Estando os ratos anestesiados, foram individualmente colocados sobre uma mesa clínica, onde as arcadas superiores e inferiores foram afastadas com o auxílio de atilhos de borracha. Estabelecida uma visão adequada dos molares superiores, foi colocado em torno do segundo molar superior esquerdo, um fio de seda. Com o uso de duas pinças porta agulha, tipo Castro-Viejo^{*****}, o fio foi colocado nos espaços interproximais, circundando a coroa do dente junto do sulco gengival, com nós

***** Bayer®, São Paulo, Brasil

++++ Ethicon 3-0 Johnson-Johnson®, São Paulo, Brasil

++++ Dopalen®, Agribrands Brasil Ltda., Paulínea, Brazil

§§§§ Rompun®, Bayer S.A., São Paulo, Brazil

***** Quinelato®, Rio Claro, Brasil

cirúrgicos na face palatina. Com o auxílio de uma sonda milimetrada o fio foi introduzido no sulco gengival. A permanência do fio foi avaliada semanalmente (Rovin, Costich *et al.*, 1966; Sanavi, Listgarten *et al.*, 1985; Samejima, Ebisu *et al.*, 1990). Quando sua ausência foi constatada o rato era novamente anestesiado e o fio recolocado.

Todos os animais foram observados até a recuperação da anestesia, quando começavam a se locomover, sendo então recolocados nas caixas-moradia.

Dieta

Os ratos receberam ração padronizada⁺⁺⁺⁺⁺, tendo como composição básica milho, farelo de soja, farinha de carne, sorgo, caulim, sal, premix mineral e premix vitamínico.

Avaliação da saúde geral

A fim de avaliar as condições de saúde geral, os ratos foram submetidos a controles de peso corporal. Os ratos foram pesados com uma frequência semanal durante o período experimental, 30 dias.

Procedimentos experimentais

Para possibilitar a avaliação do comportamento dos tecidos periodontais frente ao uso de nifedipina em situações clínicas de saúde e periodontite, os ratos foram mortos em câmara de CO₂ e imediatamente após as maxilas foram removidas e fixadas em formalina tamponada 10%. Os corpos dos ratos foram descartados de acordo com as normas do biotério.

Preparação das amostras para análise

Os procedimentos laboratoriais de confecção das peças histológicas foram realizados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

⁺⁺⁺⁺⁺ Alisul/Supra®, Anápolis, Brasil

As maxilas removidas foram fixadas em formalina tamponada 10% por um período de 48 horas. Após fixação, as peças foram submetidas ao processo de descalcificação por solução de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%) durante 40 dias aproximadamente (Anna-Morse, 1945).

As peças descalcificadas foram individualmente submetidas ao processo de neutralização com bicarbonato de sódio durante 1 hora. O processamento histológico para inclusão das peças em parafina, constituiu-se da desidratação por quatro banhos em álcool 95% (80 minutos cada), um banho em álcool absoluto (de 60 minutos), e diafanização por três banhos em xilol (80 minutos) e dois banhos em parafina líquida a 60°C (120 minutos cada), seqüencialmente para posterior emblocamento. No momento da inclusão, a face distal do segundo molar foi colocada paralela ao solo de forma que ficasse perpendicular ao plano de corte do bloco. Os cortes foram realizados em micrótomo⁺⁺⁺⁺⁺ com 5 µm de espessura, até alcançar a região contendo as raízes em seu longo eixo, conforme inspeção com auxílio de lupa. Cada bloco deu origem a três cortes, coletados a cada 20 µm de avanço.

Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e submetidos a desparafinização por dois banhos de xilol (10 minutos cada), desidratação por dois banhos de álcool absoluto (5 minutos), hidratação (1 minuto) e coloração por hematoxilina de Harris (2 minutos) e eosina (1 minuto) de forma seqüencial. Em seguida, a desidratação rápida, por meio de três banhos em álcool absoluto (1 minuto cada) e diafanização (processo de clareamento) realizado com dois banhos de xilol (10 minutos). A montagem final das lâminas foi realizada com auxílio de Entelan^{§§§§§} (Junqueira e Junqueira, 1985).

+++++ RM2155, E. Leitz®, Wetzlar, Germany

§§§§§ Merck Sharp & Dohme®, São Paulo, Brazil

Análise histológica descritiva

A análise histológica do tipo descritiva foi realizada por dois examinadores. A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio binocular óptico^{*****} com aumento de 40 vezes.

A análise descritiva considerou o aspecto do epitélio interno, juncional e sulcular, observando suas características como a presença de cristas epiteliais, ceratina, espaços intercelulares e degeneração hidrópica. Estas mesmas características foram avaliadas no epitélio externo ou epitélio bucal. No tecido conjuntivo foi observada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear ou polimorfonuclear, assim como, sua extensão e os sinais vasculares do processo inflamatório. Também foi observada a relação da base do epitélio juncional com a junção amelo cementária, o ligamento periodontal, cemento e osso alveolar.

Análise Histológica Quantitativa

Para a análise quantitativa os cortes histológicos foram visualizados em um microscópio óptico com aumento de 40 vezes. As imagens foram então digitalizadas por meio de fotografias realizadas com uma máquina digital 4 megapixels⁺⁺⁺⁺⁺ com distância focal de 4 vezes e velocidade de 1/60, acoplada a lente do microscópio. As faces vestibulares e palatinas dos cortes histológicos foram fotografadas individualmente. Para fins de conversão dos resultados de medição, foi fotografada uma escala microscópica calibradora⁺⁺⁺⁺⁺ de medida conhecida na mesma objetiva. Os campos utilizados para esta avaliação respeitavam os seguintes critérios: presença da porção coronária e radicular do segundo molar, junção amelo-cementária evidente e crista óssea passível de identificação. Também o tecido epitelial sulcular, juncional e bucal e tecido conjuntivo sem alterações decorrentes do processamento histológico.

***** Zeiss®, Jena, Germany

+++++ Nikon® Coolpix, Ayuthaya, Thailand

+++++ E. Leitz®, Wetzlar, Germany

Mensurações lineares e de área foram realizadas usando um sistema de análise de imagem Imagetool^{§§§§§§§§}. Estas foram realizadas por um único examinador que desconhecia a relação da lâmina com o seu grupo experimental. As medidas de área foram delimitadas da seguinte maneira (Figura 1):

- Área do epitélio interno considerava área do epitélio juncional de sua porção mais apical até a porção mais coronária e marginal do epitélio sulcular, que claramente dividia a área em epitélio interno e epitélio bucal (área amarela).
- Área do epitélio bucal considerava a área mais coronária do epitélio bucal que claramente dividia a área em epitélio bucal e epitélio interno, se estendendo apicalmente até a altura correspondente à base do epitélio juncional (área azul).
- Área do tecido conjuntivo gengival total considerava toda a área de conjuntivo gengival até a porção mais apical do infiltrado inflamatório relacionada com a base do epitélio juncional (área vermelha).
- Área de tecido conjuntivo inflamado correspondia a toda a área de tecido conjuntivo gengival inflamado, apresentando alterações vasculares e acúmulo de células inflamatórias, que se observou desde a porção mais próxima do epitélio interno ininterruptamente (área rosa).

As medidas lineares realizadas foram (figura 2):

- Perda óssea - Junção amelo-cementária à crista óssea;
- Espessura gengival - medida da junção amelo-cementária até a porção mais distante do epitélio bucal;
- Altura gengival – da base do epitélio juncional até a margem gengival;

^{§§§§§§§§} UTHSCSA, San Antonio, USA

Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O uso e a manipulação dos animais seguiram as normas éticas de pesquisa em saúde e direito dos animais (Goldim e Raymundo, 1997), estando de acordo com as normas operacionais do Biotério da Fundação Estadual de Pesquisa e Ensino do Rio Grande do Sul.

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.

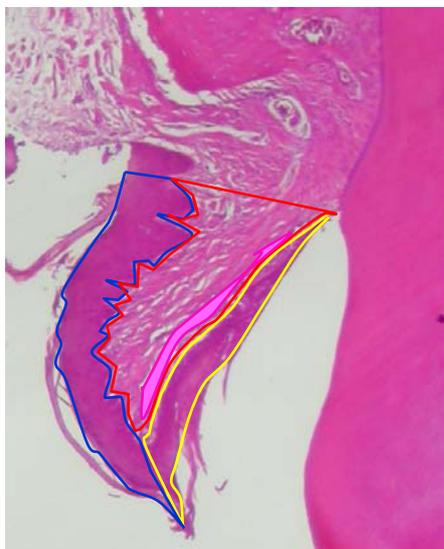


Figura 1 – Área do epitélio interno, juncional e sulcular (cor amarela), área do epitélio bucal (cor azul), área do tecido conjuntivo total (cor vermelha) e área do conjuntivo inflamado (cor rosa). Coloração HE, aumento de 5X.

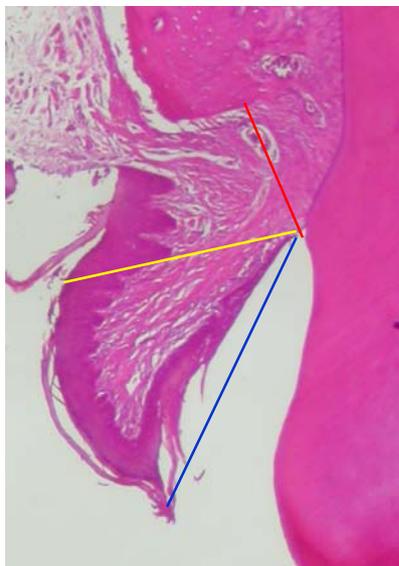


Figura 2 – Medidas lineares. Altura gengival (azul), espessura (amarelo), distância da junção amelo-cementária a crista óssea (vermelho) Coloração HE, aumento de 5X.

RESULTADOS

No grupo com ligadura um rato foi excluído em decorrência de um seqüestro ósseo junto à margem gengival, ficando este grupo com nove ratos. O grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia, perdeu um rato devido ao processamento histológico da peça, o que também ocorreu no grupo ligadura com nifedipina 10mg/kg/dia.

Análise histológica descritiva

Para a análise histológica descritiva (Figura 3) os examinadores foram informados sobre os grupos experimentais.

Na avaliação histológica do grupo controle, foi possível observar o epitélio interno dividido em epitélio juncional e epitélio sulcular com nitidez. O epitélio juncional com base na junção amelo-cementária mostrou poucas camadas celulares com união no tecido conjuntivo em linha reta (ausência de papilas coriais). O epitélio sulcular era do tipo estratificado pavimentoso ceratinizado. Observava-se diminuição progressiva da ceratinização em direção ao epitélio juncional. Nessa porção do epitélio as cristas epiteliais eram poucas e superficiais. E estas, quando presentes, estavam associadas a um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário discreto, no tecido conjuntivo fibroso, localizado na porção mais coronária. O epitélio bucal do tipo estratificado pavimentoso ceratinizado apresentava papilas coriais e ausência de qualquer sinal degenerativo e/ou proliferativo.

No grupo experimental controle com nifedipina 50mg/kg/dia, a avaliação microscópica foi semelhante ao grupo anterior. Observamos que em quatro de nove animais o epitélio interno se apresentou mais espesso, não permitindo uma diferenciação óbvia entre epitélio juncional e sulcular. O epitélio juncional se manteve com a base na junção amelo-cementária. O infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, presente no tecido conjuntivo fibroso, acompanhava paralelamente o epitélio interno.

No grupo com ligadura, foi possível observar em todos os animais perda de inserção microscopicamente já que a base do epitélio interno, epitélio da bolsa, se encontrava em posição apical à junção amelo-cementária. Neste grupo, a diferenciação morfológica entre epitélio juncional e sulcular estava perdida. O epitélio

interno mostrava papilas coriáceas em pontos variáveis da sua extensão e sinais de degeneração hidrópica. Outro detalhe a ser ressaltado foi o aumento da espessura da camada de ceratina em relação aos grupos controle e controle com nifedipina 50mg/kg/dia. O epitélio bucal apresentava cristas epiteliais mais longas quando comparado aos grupos anteriores. O infiltrado inflamatório crônico acompanhava a parede do revestimento epitelial e já se estendia de maneira mais difusa para o interior do tecido conjuntivo, em alguns casos ultrapassando a porção intermediária da espessura do tecido conjuntivo gengival. Convém salientar que, devido ao modelo experimental proposto, era possível perceber o espaço ocupado pela ligadura.

Os ratos com ligadura que receberam nifedipina 50mg/kg/dia como característica morfológica mais significativa a transformação da margem gengival em uma estrutura de formato retangular com a criação de um “plateau” de tecido. Esta mudança do formato gengival se deveu principalmente ao crescimento do tecido conjuntivo. Este tecido apresentava infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário mais concentrado na vertente interna da bolsa, mas se estendendo até o epitélio bucal. O epitélio externo apresentou projeções epiteliais abundantes e profundas. No epitélio interno não se observou distinção entre os epitélios juncional e sulcular, também mostrando projeções epiteliais e degeneração hidrópica. Neste grupo observou-se também a presença de camada de ceratina no epitélio interno que foi diminuindo sua espessura em direção ao fundo da bolsa.

O grupo com ligadura que recebeu nifedipina 10mg/kg/dia, se apresentava semelhante ao grupo com ligadura, enquanto o grupo com ligadura e nifedipina 100mg/kg/dia foi semelhante ao grupo com ligadura que recebeu 50mg/kg/dia, revelando as características microscópicas de maneira mais extensa.

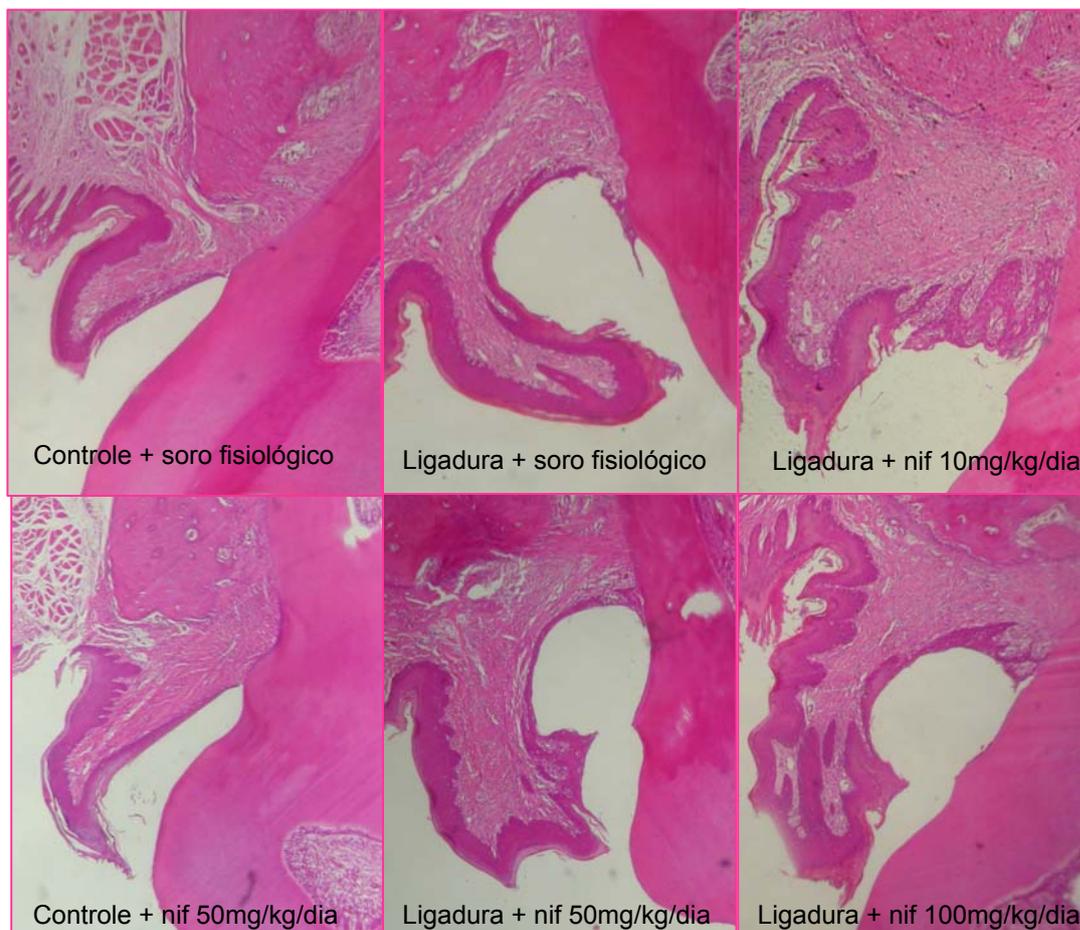


Figura 3 – Cortes histológicas corados com HE, dos grupos experimentais: grupos controle com soro fisiológico e nifedipina 50 mg/kg/dia e grupos teste: ligadura com soro fisiológico, ligadura com nifedipina 50 mg/kg/dia, ligadura com nifedipina 10 mg/kg/dia e ligadura com nifedipina 100mg/kg/dia.

Análise histológica quantitativa

As medidas de área são semelhantes estatisticamente entre os ratos do grupo controle que receberam ou não nifedipina 50mg/kg/dia (Tabela 1). Entre os ratos com ligadura que receberam ou não nifedipina 50mg/kg/dia de peso, houve diferenças significativas em relação à área de epitélio interno, que para o grupo que recebeu a medicação foi de 57% maior. O tecido conjuntivo total teve um aumento de 70% em sua área, enquanto que o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório mostrou um aumento de 65%, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Assim, a administração de nifedipina associada a uma acumulação de biofilme subgengival

levou a uma maior área de epitélio interno e tecido conjuntivo, associada com um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. A área do epitélio bucal se mostrou semelhante entre os dois grupos.

Grupos	Epitélio interno	Epitélio bucal	Conjuntivo total	Conjuntivo inflamado
Controle	18479,60 a (5231,80)	31890,22 a (9117,38)	38178,63 a (11596,30)	8764,54 a (2442,46)
Controle c/ nif 50mg/kg	16782,64 a (4025,45)	31359,23 a (8514,91)	38505,61 a (10897,00)	7888,72 a (1766,13)
Ligadura	37576,38 b (11917,42)	54098,13 b (18286,19)	82621,53 b (29472,43)	26645,22 b (7223,64)
Ligadura com nif 50mg/kg	60798,50 c (12036,67)	66014,44 b (29780,29)	118213,00 c (16341,34)	40510,53 c (9632,50)

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das medidas de área em μm^2 . Médias seguidas de letras diferentes, entre os grupos, mostram diferença estatisticamente significativa.

As medidas lineares entre os grupos controle e controle com nifedipina são semelhantes entre si (Tabela 2). Para os grupos ligadura e ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia pôde-se observar diferenças significativas estatisticamente em relação à altura gengival e espessura da gengiva. A altura gengival aumentou 75% e a espessura gengival 80% aproximadamente. Em relação à distância entre a junção amelo-cementária e crista óssea, no grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia houve uma maior perda óssea, aproximadamente 18%, que estatisticamente foi semelhante entre os dois grupos para esse período experimental.

Grupos	JAC / crista óssea	Espessura	Altura gengival
Controle	222,02 a (29,51)	386,07 a (54,42)	441,34 a (58,98)
Controle c/ nif 50mg/kg	217,57 a (26,96)	387,50 a (65,20)	438,61 a (68,02)
Ligadura	503,58 b (122,46)	566,40 b (96,26)	503,86 b (122,19)
Ligadura c/ nif 50mg/kg	562,13 b (55,44)	712,25 c (81,39)	667,91 c (90,96)

Tabela 2 – Medidas lineares e desvio-padrão em μm . Médias seguidas de letras diferentes, entre os grupos, mostram diferença estatisticamente significativa.

O gráfico 1 mostra a área do epitélio interno, epitélio bucal conjuntivo total e conjuntivo inflamado. Foram considerados os grupos que receberam ligadura com dosagens de nifedipina de 10mg/kg/dia, 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, comparados com o grupo ligadura. O epitélio interno aumentou sua área gradualmente de 10mg/kg/dia para 50mg/kg/dia, a área na dosagem de 100mg/kg/dia ficou semelhante ao grupo de 10mg/kg/dia. No entanto, o epitélio bucal manteve um aumento gradual de acordo com a dosagem. A área do conjuntivo total variou entre os grupos conforme a dosagem de nifedipina.

As medidas lineares, considerando os grupos que receberam ligadura com dosagens de nifedipina de 10, 50 e 100mg/kg/dia, comparados com o grupo ligadura são mostrados no gráfico 2. A distância da junção amelo-cementária até a crista óssea aumentou em relação ao grupo ligadura e grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia, se mantendo estável em relação ao grupo ligadura com nifedipina 100mg/kg/dia. O mesmo ocorrendo em relação à espessura e altura gengival.

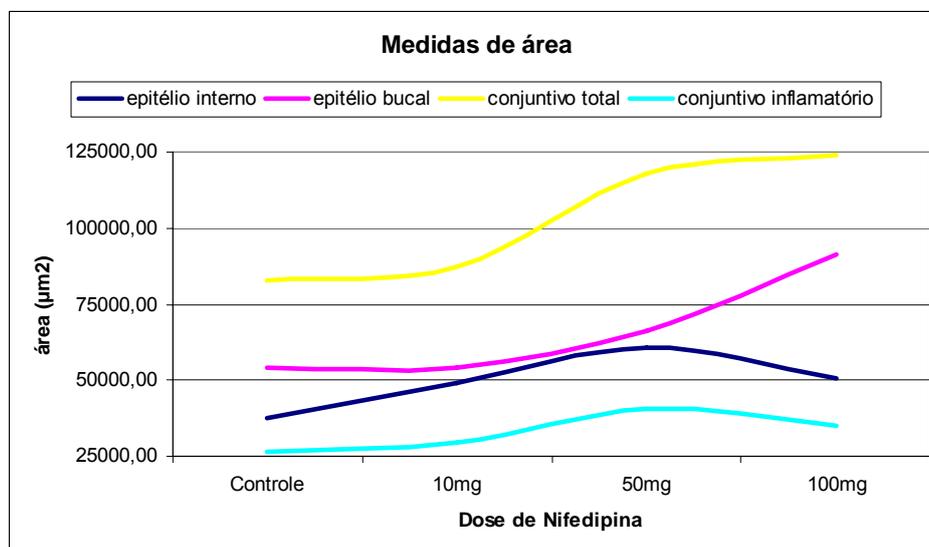


Gráfico 1 – Medidas de área em μm^2 . Grupos controle com ligadura e teste com ligadura e diferentes dosagens de nifedipina.

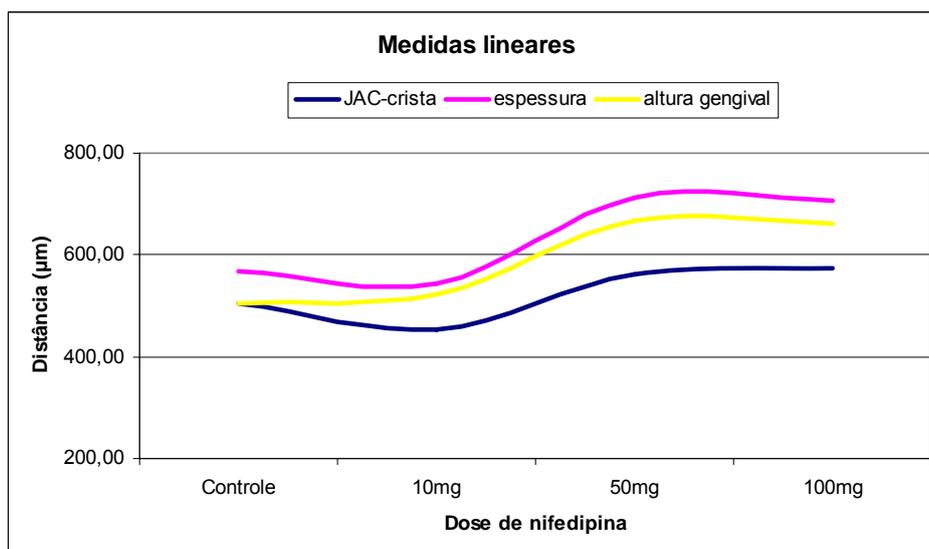


Gráfico 2 – Medida linear em μm , considerando os grupos controle com ligadura e teste com ligadura e diferentes dosagens de nifedipina.

ESTUDOS METODOLÓGICOS

DISCUSSÃO

A avaliação do processo saúde/doença periodontal vem gradualmente se modificando a partir do entendimento da etiologia e patogenia das doenças periodontais. Tradicionalmente, os métodos de diagnóstico consistiam de medidas de profundidade de sondagem e nível ósseo radiográfico, parâmetros associados principalmente com um histórico da doença (Nonnemacher, 2001). O conhecimento atual mostra a necessidade da determinação de descritores da doença associados tanto com a etiologia como com a situação inflamatória e de destruição dos tecidos periodontais. Desta forma, os descritores etiológicos são avaliados pela determinação da presença do biofilme supra e subgingival, assim como do cálculo dental. Os descritores inflamatórios são mensurados pela profundidade de sondagem e sangramento e/ou supuração e os descritores de destruição pela avaliação dos níveis clínicos de inserção e perda óssea vista radiograficamente.

Na medida em que houve uma nova sistematização para o diagnóstico do processo saúde/doença periodontal, a metodologia de avaliação para os tecidos periodontais em estudos animais necessita ser adequada a estas sistemáticas. A melhor forma de avaliar o periodonto considerando os descritores inflamatórios e de destruição em modelos animais não está totalmente aceita na literatura. Duas metodologias têm sido utilizadas, uma histológica e outra morfológica.

A avaliação histológica representa o padrão na maioria dos trabalhos que avaliam os tecidos periodontais. Susin e Rösing (2003) estudaram em ratos Wistar a altura óssea histologicamente de forma linear, considerando o espaço interproximal de primeiros e segundos molares, medindo da junção amelo-cementária até o ponto mais apical da crista óssea. Já nos estudos de Nociti, Nogueira-Filho *et al.* (2000) e Nogueira-Filho, Froes Neto *et al.* (2004) a forma de avaliar histologicamente correspondeu a uma área em mm² de perda óssea na região da furca dos primeiros molares de ratos Wistar.

Mais recentemente, a avaliação morfométrica dos tecidos periodontais para avaliar perda óssea está sendo empregada. Rivaldo, Padilha *et al.* (2005) em um modelo de estudo em ratos *Mus domesticus*, avaliaram as alterações da altura óssea em mandíbulas descarnadas, na área em mm² correspondente à perda óssea no primeiro e segundo molares. Por outro lado, Kuhr, Popa-Wagner *et al.* (2004), avaliaram em ratos Sprague-Dawley as perdas ósseas induzidas, considerando dois diferentes métodos em mandíbulas descarnadas: em um, a distância da junção amelo-cementária até a crista óssea foi medido linearmente em diferentes sítios, noutro a área de superfície radicular exposta foi medida. O estudo conclui que o método de medir a distancia linearmente deve ser preferido ao método de avaliação da área. Fica, porém, a dúvida sobre o melhor entre os diferentes métodos, histológico e morfológico, na determinação das perdas ósseas. Ainda que histologicamente seja possível à determinação das perdas, é inegável que o exame direto de maxilas é mais simples de ser realizado.

Desta forma, foi realizado um estudo em ratos Wistar para comparar os métodos histométrico e morfométrico com o objetivo de determinar a melhor maneira de reproduzir as alterações das estruturas ósseas periodontais, tanto em saúde como em doença periodontal induzida (Fernandes, Gaio, Oppermann *et al.*, 2006). A análise morfométrica foi realizada a partir de fotografias digitais das faces vestibular e palatina das maxilas descarnadas; a análise histométrica, a partir de cortes histológicos, os quais foram digitalizados, por fotografias, para a avaliação. O estudo utilizou ratos Wistar machos, para avaliar a perda óssea induzida, comparando as duas formas uma histométrica, que mede a perda óssea de forma linear (Susin e Rösing, 2003) e outra morfométrica, que mede linearmente a perda óssea em maxilas descarnadas (Kuhr, Popa-Wagner *et al.*, 2004). Procurou-se utilizar grupos de comparação tanto em relação à capacidade do método de indução em efetivamente produzir perda óssea alveolar, quanto comparar as situações das maxilas nas quais foi induzida a perda óssea através dos dois métodos de análise.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que ambos os métodos, morfométrico e histométrico foram capazes de detectar a presença de perda óssea

periodontal. As diferenças estatisticamente significativas observadas entre os dentes com e sem perda óssea induzida, para ambos os métodos, demonstrou que a colocação de ligaduras gerou perda óssea, o que pôde ser observado com as duas formas de análise. Nas áreas palatinas dos dentes com ou sem ligadura e nas vestibulares dos dentes com ligadura, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre os métodos. Entretanto, para as áreas vestibulares dos dentes sem ligadura, a avaliação histométrica mostrou um resultado estatisticamente diferente das áreas correspondentes para o método morfométrico.

Objetivamente, verificou-se que uma das limitações da histometria na medição de perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos foi a possibilidade de uma inclinação indesejável do corte histológico que, apesar dos cuidados normalmente dispensados, pode gerar uma imagem de projeção da crista óssea alveolar para oclusal. Este fato, no entanto, não descarta sua utilização, pois a análise histológica mostra características positivas para outras análises como, por exemplo, a possibilidade de avaliação celular, de estrutura dos tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo. Já a avaliação morfométrica ficaria limitada à avaliação das alterações da crista óssea alveolar.

Estudos objetivando analisar o processo de doença através da perda óssea poderiam optar pelo método morfométrico em maxilas descarnadas. Estudos onde além da progressão da doença também respostas inflamatórias sejam consideradas devem optar por análises histológicas. Uma outra questão pendente a este último método é a otimização do processamento histológico buscando uma melhor visualização dos cortes.

Na literatura, os estudos de doença periodontal em animais não apresentam uma padronização no que se refere ao processamento histológico, quanto ao tempo de fixação, descalcificação e tipo de substância descalcificadora utilizada (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996; Chiu, Fu *et al.*, 2001; Shimizu, Kataoka *et al.*, 2002). O tempo de fixação das peças histológicas é variável e não se apresentam critérios de avaliação pré-determinados na relação entre os métodos de fixação com a descalcificação. É importante ressaltar que o tempo de fixação e o agente descalcificador utilizado têm

relevância para a qualidade dos preparos histológicos e, conseqüentemente, na precisão da análise dos resultados das pesquisas (Stevens, Lowe *et al.*, 1996). Os tecidos epiteliais e conjuntivos são alterados pela exposição prolongada aos meios de descalcificação. Muitas vezes, na tentativa de se obter um bom resultado histológico dos tecidos calcificados, danos são observados nos tecidos moles (Correa, Oliveira *et al.*, 2003). Outras vezes, o tecido mole está convenientemente preservado, porém a peça não se encontra completamente descalcificada, o que dificulta a obtenção de cortes que preencham os requisitos necessários para a análise simultânea de ambos tipos de tecidos. As técnicas de fixação e descalcificação são práticas de rotina nos diferentes laboratórios. No entanto, os estudos apresentam poucos detalhes acerca do processamento histológico, não estando essa rotina acessível nos meios de consulta bibliográfica disponível (Rovin, Costich *et al.*, 1966; Nociti, Nogueira-Filho *et al.*, 2000; Chiu, Fu *et al.*, 2001).

Assim, foi realizado um estudo com objetivo de avaliar as características histológicas dos tecidos periodontais em maxila de ratos Wistar, comparando diferentes tempos de fixação associados à descalcificação das peças por ácido nítrico a 5% ou ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20% (Fernandes, Gaio, Rosing *et al.*, 2006).

As repercussões histológicas dos diferentes tempos de fixação em formalina 10 % utilizando duas soluções descalcificadoras mostrou que a relação entre a junção amelo-cementária e a crista óssea se mantiveram sem alterações significativas. Quando a presença de cimento íntegro e ligado à superfície radicular foi determinada, os menores índices de deslocamento aconteceram no período de fixação de 48 horas, principalmente quando a descalcificação foi por ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20%. O padrão de desmineralização da dentina, considerando uma desmineralização adequada e uma desmineralização inadequada, mostrou situações variadas nos diferentes momentos experimentais para as diferentes soluções descalcificadoras, não obedecendo a um padrão. A avaliação microscópica descritiva dos cortes histológicos mostrou uma melhor uniformidade na coloração e diferenciação na união do tecido epitelial e conjuntivo quando se utilizou

um período de fixação de 48 horas e descalcificação em ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20%.

As contribuições metodológicas do presente estudo permitiram que se abordassem os objetivos experimentais de forma mais segura, com base em evidências que suportam os métodos empregados. Além disso, as considerações metodológicas devem contribuir para que estudos realizados nesta linha de pesquisa possam se referenciar de forma a assegurar melhores resultados baseados em técnicas apropriadas para o estudo do processo saúde/doença periodontal.

ESTUDOS EXPERIMENTAIS

DISCUSSÃO

A avaliação do processo saúde/doença periodontal vem gradualmente se modificando a partir do entendimento da etiologia e patogenia das doenças periodontais. Na medida em que houve uma nova sistematização para o diagnóstico do processo saúde/doença, a metodologia de avaliação para os tecidos periodontais, em estudos animais, foi adequada a estas (Gaio, Fernandes *et al.*, 2003). Surgindo, desta forma, um questionamento sobre qual a repercussão clínica e histopatológica dos aumentos de volume gengival frente a esta sistemática de avaliação, que considera descritores etiológicos, inflamatórios e de destruição. Pois, de uma maneira geral os estudos que avaliam aumentos de volume gengival não inter-relacionam os diferentes descritores de doença (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Spolidorio, Spolidorio *et al.*, 2002; Gonçalves, Nogueira Filho *et al.*, 2003).

Neste estudo, dois grupos com saúde periodontal receberam um administração de 50mg/kg/dia de soro fisiológico, e outro nifedipina 50mg/kg/dia (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996). Os grupos teste foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005) e receberam soro fisiológico ou nifedipina 50mg/kg/dia (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996). Para outros dois grupos teste foi administrado nifedipina 10mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia como forma de avaliar o efeito das diferentes dosagens sobre os tecidos periodontais. Para os grupos experimentais controle e teste com nifedipina 50

mg/kg/dia foram utilizados dez ratos, enquanto que para os grupos teste com nifedipina 10 e 100 mg/kg/dia foram cinco ratos por grupo.

A maioria das pesquisas trabalha com grupos que variam de cinco a quinze ratos, amostras estas que se assemelham às utilizadas nesse estudo (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Ishida, Kondoh *et al.*, 1995; Chiu, Fu *et al.*, 2001; Shimizu, Kataoka *et al.*, 2002; Cavagni, Soletti *et al.*, 2005).

A administração de nifedipina via oral foi efetuada por meio de sonda gástrica, por apresentar absorção estável e controlada (Kondo e Sugimoto, 1987). Outros estudos também utilizam a administração da nifedipina por via oral (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Ishida, Kondoh *et al.*, 1995), no entanto, esta é colocada na alimentação. A nifedipina é sensível à luz, e sofre fotodegradação de 20% em três horas e 40% em seis horas (Helin, Kontra *et al.*, 1998). Desta forma, a colocação da nifedipina na dieta pode não ser a forma mais adequada.

Os resultados histológicos descritivos (Figura 3), deste estudo mostraram que quatro de nove animais, do grupo controle com nifedipina 50 mg/kg/dia, apresentavam um epitélio interno mais espesso, não permitindo uma diferenciação óbvia entre epitélio juncional e sulcular, representando uma discreta hiperplasia epitelial. A avaliação da área do tecido epitelial interno não mostrou diferenças significativas entre os ratos que receberam ou não nifedipina. O infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, presente no tecido conjuntivo fibroso, acompanhava paralelamente o epitélio interno. Não existindo diferenças na medida entre a área do tecido conjuntivo total, a área de conjuntivo inflamado ou a espessura gengival. Caracterizando, com estes resultados, que ratos submetidos à nifedipina apresentaram alterações histopatológicas, mas não um aumento de volume gengival.

Morisaki, Kato *et al.* (1993) avaliaram histologicamente os tecidos periodontais de ratos com saúde periodontal submetidos à administração de nifedipina e mostraram um tecido epitelial com marcada hiperplasia. Cristas epiteliais longas foram observadas no epitélio sulcular, sem alterações no epitélio juncional. O tecido conjuntivo apresentou infiltrado inflamatório na porção subepitelial. Clinicamente foi possível observar aumento de volume gengival. Achados semelhantes foram vistos

por Kataoka, Shimizu *et al.* (2001) e Shimizu, Kataoka *et al.* (2002) que avaliando a espessura do tecido epitelial encontraram diferenças significativas estatisticamente, resultados semelhantes aos encontrados por Spolidorio, Spolidorio *et al.* (2002)

A altura gengival, avaliada em cortes histológicos, nos ratos que receberam nifedipina 50mg/kg/dia, não mostrou alterações consideráveis. Morisaki, Kato *et al.* (1993) e Ishida, Kondoh *et al.* (1995) avaliaram a profundidade de sondagem clinicamente, sob um microscópio estereoscópico, e observaram diferenças significativas. A comparação desses resultados com os do presente estudo é limitada, pois os autores utilizam um modelo de mensuração da profundidade de sondagem que pode ser alterado por diferentes fatores (Bulthuis, Barendregt *et al.*, 1998; Garnick e Silverstein, 2000).

As diferenças entre os resultados se devem, principalmente, à forma de avaliação. Na maioria dos estudos não foi realizado o cegamento do examinador quanto aos grupos experimentais, noutros estudos as diferenças de espessura são observadas qualitativamente o que torna difícil uma comparação dos resultados.

As maiores alterações foram observadas entre os grupos onde a periodontite foi induzida pelo uso de ligaduras. Histologicamente, a diferenciação morfológica entre o epitélio juncional e sulcular estava perdida. O epitélio interno mostrava papilas coriáceas em pontos variáveis da sua extensão e sinais de degeneração hidrópica. O epitélio bucal apresentava cristas epiteliais mais longas quando comparado aos grupos anteriores. A área do epitélio interno e epitélio bucal mostraram uma diferença significativa para o grupo que recebeu nifedipina 50mg/kg/dia.

Todos os animais apresentavam perda de inserção microscopicamente, mas o grupo que recebeu nifedipina teve uma perda óssea 18% maior, ainda que sejam valores semelhantes. Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* (2003) quantificou o volume de perda óssea na região da bifurcação, e também não observou diferenças significativas estatisticamente entre os grupos.

Poucos estudos em animais estão relacionados com periodontite. Fu, Nieh *et al.* (1997) avaliaram em ratos o efeito da ciclosporina, comparando um lado com

ligadura com o contralateral sem ligadura. Os resultados mostraram que dentes com ligadura apresentavam um aumento estatisticamente significativo no volume dos tecidos epitelial e conjuntivo total, assim como no infiltrado inflamatório e tecido gengival total. Observaram, assim, um aumento de volume gengival óbvio nos dentes com ligadura.

Estudos em humanos também observaram ser as variáveis periodontais, principalmente o biofilme e a inflamação gengival, importantes fatores de risco para a expressão dos aumentos de volume gengival (Bullon, Machuca *et al.*, 1995; Tavassoli, Yamalik *et al.*, 1998).

O infiltrado inflamatório crônico acompanhava a parede do revestimento epitelial e já se estendia de maneira mais difusa para o interior do tecido conjuntivo. Os ratos com ligadura e administração de nifedipina tiveram como característica morfológica mais significativa a transformação da margem gengival em uma estrutura de formato retangular com a criação de um “plateau” de tecido. Esta mudança do formato gengival se deveu principalmente ao crescimento do tecido conjuntivo. Este tecido apresentava um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário mais concentrado na vertente interna da bolsa, se estendendo até o epitélio bucal. Neste grupo, tanto a área total do tecido conjuntivo como a área de conjuntivo inflamado se mostrou maior estatisticamente significativa, assim como a altura gengival e espessura gengival, caracterizando, desta forma não somente alterações histopatológicas, mas também um aumento de volume gengival.

O grupo com ligadura que recebeu nifedipina 10mg/kg/dia, se apresentava semelhante ao grupo com ligadura sem medicação, enquanto que o grupo com ligadura e nifedipina 100mg/kg/dia, foi semelhante ao grupo que recebeu 50mg/kg/dia, revelando as características microscópicas de maneira mais extensa (Figura 3). Estes resultados confirmaram os achados de Chiu, Fu *et al.* (2001) que compararam dosagens de 10 e 50mg/kg/dia e encontraram diferenças somente quando a dosagem de nifedipina foi maior.

Desta forma, podemos concluir que a presença de nifedipina por si só não acarreta um aumento de volume gengival em uma situação de saúde periodontal em

ratos. Nesta situação podemos observar somente discretas alterações histopatológicas vistas no epitélio interno, como a ausência de diferenciação entre epitélio juncional e sulcular. Os aumentos de volume gengival em ratos se mostraram dependentes de um padrão inflamatório bem estabelecido, mostrado tanto pelo aumento do infiltrado inflamatório como pelo aumento da espessura e altura gengival.

CONCLUSÕES

- A presença de nifedipina por si só não acarretou um aumento de volume gengival;
- A presença de nifedipina levou a discretas alterações histopatológicas, representadas pela ausência de diferenciação entre epitélio juncional e sulcular;
- Os aumentos de volume gengival foram dependentes de um padrão inflamatório bem estabelecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol, v.4, n.1, Dec, p.1-6. 1999.

Barak, S., I. S. Engelberg, *et al.* Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings. J Periodontol, v.58, n.9, Sep, p.639-42. 1987.

Barclay, S., J. M. Thomason, *et al.* The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. J Clin Periodontol, v.19, n.5, May, p.311-4. 1992.

Bullon, P., G. Machuca, *et al.* Clinical assessment of gingival size among patients treated with diltiazem. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.79, n.3, Mar, p.300-4. 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.

Butler, R. T., K. L. Kalkwarf, *et al.* Drug-induced gingival hyperplasia: phenytoin, cyclosporine, and nifedipine. J Am Dent Assoc, v.114, n.1, Jan, p.56-60. 1987.

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.

Chiu, H. C., E. Fu, *et al.* Does nifedipine aggravate cyclosporin--induced gingival overgrowth? An experiment in rats. J Periodontol, v.72, n.4, Apr, p.532-7. 2001.

Correa, C., M. Oliveira, *et al.* Avaliação das alterações microscópicas em material submetido a agentes descalcificadores. XV Salão de Iniciação Científica, p.554. 2003.

Ellis, J. S., R. A. Seymour, *et al.* Gingival sequestration of nifedipine in nifedipine-induced gingival overgrowth. Lancet, v.339, n.8806, Jun 6, p.1382-3. 1992.

_____. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. J Periodontol, v.70, n.1, Jan, p.63-7. 1999.

Fattore, L., M. Stablein, *et al.* Gingival hyperplasia: a side effect of nifedipine and diltiazem. Spec Care Dentist, v.11, n.3, May-Jun, p.107-9. 1991.

Fernandes, M. I., E. J. Gaio, *et al.* Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. Brazilian Oral Research (accepted) 2006.

_____. Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. Brazilian Oral Research (submitted). 2006.

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.

Gaio, E. J., M. I. Fernandes, *et al.* Analysis morphometric and hystometric bone height in induced periodontites. Works presented in The 21st Annual Meeting of the Brazilian Society for Oral Research, Available from: <http://iadr.confex.com/iadr/brazil04/preliminaryprogram/abstract55977.htm>. 2003.

Garnick, J. J. e L. Silverstein. Periodontal probing: probe tip diameter. J Periodontol, v.71, n.1, Jan, p.96-103. 2000.

Goldim, J. R. e M. M. Raymundo. Princípios Gerais da Pesquisa com Animais. Porto Alegre: HCPA. 1997.

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.

Hallmon, W. W. e J. A. Rossmann. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. Periodontol 2000, v.21, Oct, p.176-96. 1999.

Helin, M. M., K. M. Kontra, *et al.* Content uniformity and stability of nifedipine in extemporaneously compounded oral powders. Am J Health Syst Pharm, v.55, n.12, Jun 15, p.1299-301. 1998.

Henry, P. D. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. Am J Cardiol, v.46, n.6, Dec 1, p.1047-58. 1980.

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.

Johnson, I. H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. J Periodontal Res, v.10, n.6, Dec, p.332-45. 1975.

Junqueira, L. e L. Junqueira. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Nobel. 1985

- Kataoka, M., Y. Shimizu, *et al.* Nifedipine induces gingival overgrowth in rats through a reduction in collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. J Periodontol, v.72, n.8, Aug, p.1078-83. 2001.
- Klausen, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. J Periodontol, v.62, n.1, Jan, p.59-73. 1991.
- Kondo, S. e I. Sugimoto. Moment analysis of intravenous, intraduodenal, buccal, rectal and percutaneous nifedipine in rats. J Pharmacobiodyn, v.10, n.9, Sep, p.462-9. 1987.
- 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.
- 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.
- Morisaki, I., K. 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.
- Nakou, M., J. J. Kamma, *et al.* Subgingival microflora associated with nifedipine-induced gingival overgrowth. J Periodontol, v.69, n.6, Jun, p.664-9. 1998.
- Nery, E. B., R. G. Edson, *et al.* Prevalence of nifedipine-induced gingival hyperplasia. J Periodontol, v.66, n.7, Jul, p.572-8. 1995.
- 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.
- Nociti, F. H., Jr., G. R. Nogueira-Filho, *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. J Periodontol, v.71, n.9, Sep, p.1460-4. 2000.
- Nogueira-Filho, G. R., E. B. Froes Neto, *et al.* Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. J Periodontol, v.75, n.3, Mar, p.348-52. 2004.
- Nonnemacher, C Parâmetros clínicos e radiográficos no diagnóstico periodontal. In: Oppermann, RV, Rosing,CK, Periodontia Ciência e Clínica, Artes Médicas, São Paulo,. 2001, p. 458.
- Rivaldo, E. G., D. P. Padilha, *et al.* Alveolar bone loss and aging: a model for the study in mice. J Periodontol, v.76, n.11, Nov, p.1966-71. 2005.
- Rosen, W. J. e C. E. Johnson. Evaluation of five procedures for measuring nonstandard doses of nifedipine liquid. Am J Hosp Pharm, v.46, n.11, Nov, p.2313-7. 1989.

- Rovin, S., E. R. Costich, *et al.* The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J Periodontal Res, v.1, n.3, p.193-204. 1966.
- 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.
- Samejima, Y., S. Ebisu, *et al.* Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontal Res, v.25, n.5, Sep, p.308-15. 1990.
- Sanavi, F., M. A. Listgarten, *et al.* The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. J Periodontol, v.56, n.5, May, p.273-80. 1985.
- Shimizu, Y., M. Kataoka, *et al.* Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. J Periodontol, v.73, n.8, Aug, p.861-7. 2002.
- Slavin, J. e J. Taylor. Cyclosporin, nifedipine, and gingival hyperplasia. Lancet, v.2, n.8561, Sep 26, p.739. 1987.
- Spolidorio, 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.
- Stevens, A., J. Lowe, *et al.* Theory and Practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone. 1996
- Susin, C. e C. K. Rosing. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. Acta Odontol Scand, v.61, n.5, Oct, p.273-7. 2003.
- Tavassoli, S., N. Yamalik, *et al.* The clinical effects of nifedipine on periodontal status. J Periodontol, v.69, n.2, Feb, p.108-12. 1998.
- Thomason, J. M., J. S. Ellis, *et al.* Nifedipine pharmacological variables as risk factors for gingival overgrowth in organ-transplant patients. Clin Oral Investig, v.1, n.1, Feb, p. 25-9. 1997.
- Thomason, J. M., R. A. Seymour, *et al.* The prevalence and severity of cyclosporine and nifedipine induced gingival overgrowth.. J Clin Periodontol, v 20, p. 37-40, 1993.

ARTIGO I

Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats

Marilene Issa Fernandes^{1,2}

Eduardo José Gaio¹

Rui Vicente Oppermann²

Pantelis Varvaki Rados²

Cassiano Kuchenbecker Rösing²

¹Graduate students, Graduate Dentistry Program, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Professors, Graduate Dentistry Program, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running title: **Bone height in periodontitis in rats**

Author responsible for correspondence:

Marilene Issa Fernandes

Avenida Getúlio Vargas, 1570/202

90150-004 Porto Alegre – RS - Brazil

Key words: alveolar bone loss, experimental models, histometric analysis, morphometric analysis

Aceito para publicação no Brazilian Oral Research.

ABSTRACT

Objective: To compare histologic and morphometric procedures of bone height measurement.

Background: Microscopic measurements are the most frequent method in periodontal studies with animals, but have limited capacity to identify bone levels associated with both healthy tissues and periodontal disease.

Methods: Ligatures were placed in maxillary left second molars of 10 male 60-day-old Wistar rats for 30 days. Left and right maxillary sides of 5 rats were processed for histologic analysis (H), sectioned buccolingually, and stained with HE. The maxillae of the other 5 rats were defleshed and used for morphometric analysis (M). Histometric measurements from the cemento-enamel junction to the bone crest were performed. Standardized photographs were used for morphometric analysis. *T* tests were used for dependent or independent samples ($\alpha=0.05\%$).

Results: Distances from cemento-enamel junction to bone crest were 0.95 ± 0.25 and 1.07 ± 0.30 for the H and M. Buccal measurements were 0.92 ± 0.16 and 1.08 ± 0.35 for H and M. Values obtained using the H and M for areas without ligatures were 0.44 ± 0.15 and 0.47 ± 0.11 mm for lingual measurements and 0.23 ± 0.008 and 0.41 ± 0.10 for buccal measurements.

Conclusion: No significant differences were found between the two methods in the detection of bone height differences associated with the placement of ligatures in rats.

INTRODUCTION

Rats have been used in periodontal disease studies (1-5) because their periodontal tissue structure in the molar region is similar to that of human beings (6). Moreover, rats can be kept in germfree conditions (7,8) and have their immunologic capacity compromised (9), which makes them an attractive model for better understanding of the pathogenesis of periodontal diseases.

Several methods have been used to evaluate periodontal bone loss in rats. Studies have described lesions macroscopically (10-12), histologically (13-15) or radiographically (3,10,11). The histologic method is the criterion standard currently, but has drawbacks, especially because the pattern of bone resorption in periodontitis is not uniform (4,16). In addition, problems during histologic processing, difficulties in carrying it out, its high cost and high time demands are well-known disadvantages of histologic analyses. However, histologic sections can be used not only for the investigation of alveolar bone loss, but also for other studies, such as loss of attachment (17), inflammatory infiltrate (18), tissue characteristics such as collagen type (19), and immunohistochemical analyses (20)

Differences in bone resorption may be important for the evaluation of the methods under investigation in this study. As bone loss is one of the outcomes of periodontal disease, the development of an alternative method to determine the exact anatomy of bone defects is necessary. Therefore, this study compared the measurement of bone height in healthy and diseased periodontal tissue using histologic sections and morphologic analysis of dry bone.

METHODS

Animal Model

Ten male 60-day-old Wistar rats weighing 250 to 350 grams were used. The rats were kept in plastic cages and received food and water ad lib. The animals were kept in a gnotobiotic environment in the Biomedical Sciences Institute of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This study was

approved by the Ethics Committee of the School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Experiment For the placement of ligatures (3-0 cotton suture) to induce bone loss, the animals were anesthetized with IM administration of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. Ligatures were placed in the maxillary left second molar (test side) and were kept for 30 days. Contralateral teeth, without ligatures, were used as controls. Rats were euthanized by cervical dislocation. Maxillae were removed and sectioned medially.

Specimen preparation and histologic analysis

Ten maxillary sides (test and control sides) were fixed in 10% buffered formalin for 48 hours. The specimens were kept in 20% sodium citrate-50% formic acid solution for 40 days for decalcification. The decalcified specimens were individually neutralized in sodium bicarbonate and prepared for histologic analysis. The specimens were embedded, and three 3- μ m buccolingual sections (RM2155 Microtome, Ernst Leitz® - Germany) from the maxillary second molar area (21) were obtained from each specimen. The sections were stained with HE (22).

The criterion for inclusion of slides was the presence of a portion of root, epithelial tissue and bone crest in the same section. Images of these sections were captured by a 4-megapixel digital camera (Nikon® Coolpix) at 50X magnification. A calibrating microscopic scale (E. Leitz® Wetzlar) was photographed together with the section to be used for conversion of measurement results. An observer, blinded to the group to which the slide belonged, used the ImageTool® software to obtain 3 linear measurements from bone crest to cementoenamel junction (CEJ) at the buccal and palatal root of the second upper molar. The longest measure was selected for the analysis of results (Figure 1).

Specimen preparation and morphologic analysis

Ten maxillary sides (test and control sides) were defleshed after immersion in 8% sodium hypochlorite (Qboa®) for 4 hours. The specimens were washed in running water and immediately dried

with compressed air. To outline the CEJ, 1% methylene blue was applied to the specimens for 1 minute. Photographs were obtained with a 6.1-megapixel digital camera (Nikon® D100) on a tripod to keep the camera parallel to the ground at the minimal focal distance. The specimens were fixed in wax and kept with their occlusal plane parallel to the ground and their long axis perpendicular to the camera. Photographs of the buccal and lingual aspects were made. To validate measurement conversions, a millimeter ruler was photographed together with all specimens. The ImageTool® software was used by an observer blinded to the group to which the slide belonged to obtain 3 linear measurements from the bone crest to the cemento-enamel junction (CEJ). The longest measure was selected for the analysis of results (Figure 2).

Statistical analysis

Mean (\pm standard deviation) distances from the CEJ to the bone crest were obtained for the test and control sides of the maxillae analyzed by both the histologic and morphometric methods. For intragroup morphometric or histologic analysis, the measure of the ligature sides and the sides without ligatures were compared with a *t* test for paired samples. For the analysis between groups, comparing morphometry with histology, the test and control sides were compared with a *t* test for independent samples. Significance level was established at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

Results are shown in Figure 3 and Table 1. In all the buccal and lingual areas evaluated by histometric and morphometric analyses, ligatures generated a greater alveolar bone loss, and differences were statistically significant (*t* test for paired samples; $p < 0.05$).

Table 1 compares the histometric and morphometric methods. The lingual areas of teeth with or without ligature and the buccal areas of teeth with ligatures showed no significant differences between methods (*t* test for paired samples; $p > 0.05$). However, a mean value (\pm standard deviation) of

0.23 (\pm 0.08) for the buccal area of teeth without ligature was found in the histometric analysis. This result was statistically different from the mean obtained for corresponding areas when the morphometric method was used (0.41 ± 0.10).

DISCUSSION

This study compared two methods - histometry and morphometry - to evaluate ligature-induced alveolar bone loss in Wistar rats. As different forms of bone loss evaluation have been reported in literature, the purpose of this study was to develop a reliable study method.

Histologic evaluation is the standard method used in most studies. Susin & Rösing (23) used Wistar rats and evaluated bone height histologically in a linear procedure; they used the interproximal space of first and second molars and measured the distance from the CEJ up to the apical-most point of the bone crest. Nociti et al. (13) and Nogueira-Filho et al. (24) used histology to measure bone loss area (mm^2) in first molar furcation of Wistar rats.

Other forms of bone loss evaluation have been used recently. Rivaldo et al. (25) used defleshed mandibles of *Mus domesticus* rats to evaluate changes in bone height and measured bone loss as the exposed root surface area (mm^2) in first and second molars. Bone loss was measured as follows: mesially, a line from CEJ to the bone height in the mesial root of the first molar, and distally, a line for the CEJ to the bone crest of the distal root of the second molar; coronally, to the apical-most portion of the CEJ, and apically, to the apical-most point of the bone crest. Kuhr et al. (26) evaluated ligature-induced bone loss in defleshed mandibles of rats using two methods. In one method, the distance from the CEJ to the bone crest was measured linearly in different sites; in the other, the exposed root surface area was measured. Their study concluded that the method of measuring the linear distance should be preferred to the method of area evaluation.

This study used 5 Wistar rats to evaluate induced bone loss and compare two methods: histologic evaluation, measuring bone loss linearly (23); and morphometric evaluation, measuring bone loss linearly in defleshed maxillae (26). The observer was previously trained to conduct the

measurements and was blinded to which experimental group the images belonged (27). The study and control groups were used to compare the capacity of the induction method to generate alveolar bone loss and to compare maxillae in which bone loss was induced using two different methods of analysis.

The main purpose of this study was the comparison of the histometric and morphometric methods. Therefore, sections were buccolingual and not mesiodistal, differently from most studies (14,28). Morphometric analysis used digital photographs of the buccal and lingual aspects of the dry maxillae. The histometric analysis used histologic sections whose images were digitized for evaluation. The results of this study showed that both methods are capable of detecting vertical periodontal bone loss in test and control teeth. The statistically significant differences found between teeth with and without ligatures in both methods demonstrated that the placement of ligatures generated bone loss, which validates the use of ligatures in this study. Moreover, bone loss generated by ligatures was found in both histometric and morphometric analyses (Figure 3).

The comparison between methods, however, revealed statistically significant differences between the groups without ligature when the buccal surface was analyzed. No differences between methods were found in the analysis of the other tooth surfaces (Table 1). Future studies should investigate an explanation for this finding. However, the low values (mean = 0.23) found for the control group (without ligature) in the histometric analysis of the buccal surfaces were substantially lower than those reported for control groups in studies with rats in which the same distance was measured. Moreover, the mean value for the group without ligature in the morphometric analysis was 0.41 mm, similar to the values obtained in the histometric and morphometric analyses of the lingual areas. This finding was discrepant with findings for the other groups in this study, and might have been caused by an unwanted inclination of the histologic sections. Despite the care taken, such inclination may have generated an occlusal image of alveolar bone crest. This is one of the problems of histometry, particularly when maxillae, for which parallel positioning may be difficult to obtain, are the object of investigation. The concomitant use of morphometric analysis may mitigate such effect. However, this objective limitation of histometric measurements of ligature-induced alveolar bone loss in rats should

not preclude its use. Other positive characteristics of histologic analysis should be explored, such as the possibility of identifying cell elements and components of soft tissue.

This study contributed to the understanding that the use of morphometric analysis may be an alternative to histometric evaluations because it is faster, easier and less expensive, particularly when the only purpose of the study is to measure bone loss. Both methods are capable of detecting ligature-induced differences in bone height in rats.

REFERENCES

1. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J Dent Res* 1960; **39**: 923-935.
2. Jordan HV, Keyes PH, Bellack S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. *J Periodontal Res* 1972; **7**: 21-28.
3. Heijl L, Wennström J, Lindhe J, Socransky SS. Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res* 1980; **15**: 405-419.
4. Klausen B, Hougen HP, Eriksen WH, Fiehn NE. Introduction of periodontal bone loss in athymic (nude) rats monoinfected with *Streptococcus mutans*. *J Periodontal Res* 1986; **21**: 5-12.
5. Chang KM, Ramamurthy NS, Mcnamara TF, Genco RJ, Golub LM. Infection with a gram-negative organism stimulates gingival collagenase production in non-diabetic and diabetic germfree rats. *J Periodontal Res* 1988; **23**: 239-244.
6. Bage RC, Schroder HE. *Periodontitis in man and other animals. A comparative review*. Basel: Karger, 1982: 330.
7. Amstad-Jossi M, Schroder HE. Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and gingival connective tissue composition in germfree rats. *J Periodontal Res* 1978; **13**: 76-90.

8. Crowford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodontal Res* 1978; **13**: 316-325.
9. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2004; **39**: 188-193.
10. Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res* 1989; **97**: 494-499.
11. Bjornsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res* 2003; **38**: 543-550.
12. Tatakis DN, Guglielmoni P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol* 2000; **71**: 1395-1400.
13. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000; **71**: 1460-1464.
14. Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Fonnum F. Postnatal glutamate-induced central nervous system lesions alter periodontal disease susceptibility in adult Wistar rats. *J Clin Periodontol* 2001; **28**: 904-909.
15. Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol* 1996; **67**: 463-471.
16. Schmidt LJ, Rowe DJ. The effects of diphosphonates on alveolar bone loss. *Quintessence Int* 1987; **18**: 497-501.
17. Dayan S, Stashenko P, Niederman R, Kupper TS. Oral epithelial overexpression of IL-1alpha causes periodontal disease. *J Dent Res* 2004; **83**: 786-790.
18. 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; **31**: 596-603.

19. Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y. Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *J Periodontol* 2004; **75**: 243-248.
20. Sculean A, Berakdar M, Windisch P, Remberger K, Donos N, Brex M. Immunohistochemical investigation on the pattern of vimentin expression in regenerated and intact monkey and human periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 2003; **48**: 77-86.
21. Fernandes MI, Gaio EJ, Rösing CK, Oppermann RY, Rados PV. Avaliação qualitativa microscópica do tempo de fixação e meio de descalcificação do periodonto em maxila de ratos. *Brazilian Oral Research* 2003; **17**: 206 (Suppl 2).
22. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1983: 123p.
23. Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003; **61**: 273-277.
24. Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, et al. Nicotines effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: A histometric study in rats. *J Periodontol* 2004; **75**: 348-352.
25. Rivaldo EG, Padilha DP, Hugo FN. Alveolar bone loss and aging: a model for the study in mice. *J Periodontol* 2005; **76**: 1966-1971.
26. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontol Res* 2004; **39**: 101-106.
27. Susin C, Rösing CK. *Praticando Odontologia: Baseada em Evidências*. Canoas: Ulbra, 1999: 167.
28. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1966; **1**: 193-204.



Figure 1 – Histologic analysis: linear measurement from bone crest to cementoenamel junction.

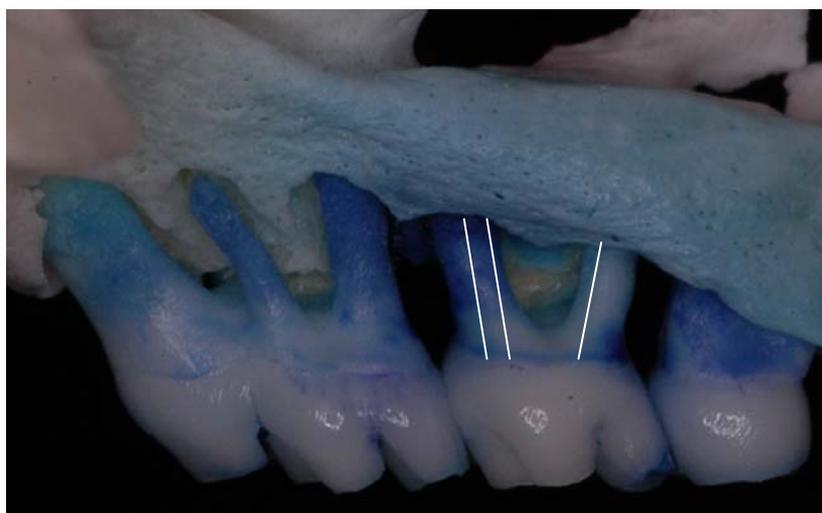


Figure 2 – Morphometric analysis: linear measurement from bone crest to cementoenamel junction.

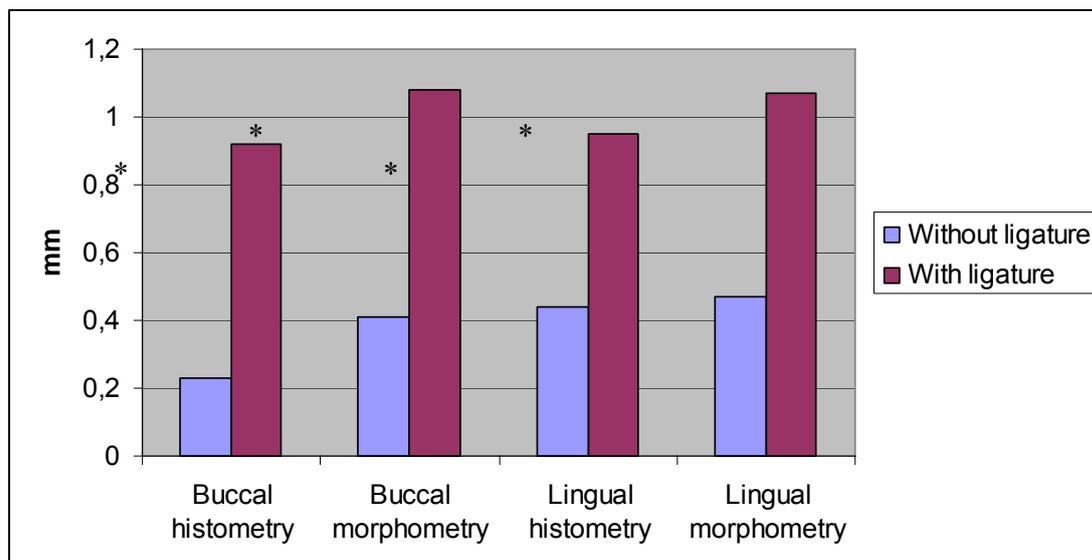


Figure 3 – Comparison between histologic and morphologic methods for buccal and lingual areas with and without ligatures. *Statistically significant different mean values between teeth with and without ligatures – paired simple t test.

Table 1 – Comparison between histologic and morphologic methods for buccal and lingual areas with and without ligatures

	Buccal with ligature	Lingual with ligature	Buccal without ligature	Lingual without ligature
Histometry	0.92 ± 0.16	0.95 ± 0.25	0.23 ± 0.08*	0.44 ± 0.15
Morphometry	1.08 ± 0.35	1.07 ± 0.30	0.41 ± 0.10*	0.47 ± 0.11

* statistically significant difference between Histometry and Morphometry (t test for independent samples)

ARTIGO II

**Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat
maxillary periodontium**

**Avaliação microscópica qualitativa do tempo de fixação e meios de descalcificação do
periodonto de ratos**

Marilene Issa Fernandes, DDS, MSc*

Eduardo José Gaio, DDS***

Cassiano Kuchenbecker Rösing, DDS, MSc, PhD *

Rui Vicente Oppermann, DDS, PhD *

Pantelis Varvaki Rados, DDS, MSc, PhD

ABSTRACT: The rat model is widely used in periodontal research and quality of histological sections is essential. The purpose of this study was to evaluate histological characteristics of periodontal tissues in Wistar rat maxillae, with different times of fixation and decalcified by nitric acid (NA) or formic acid (FASC). 15 rats were used. Fixation was performed for 24, 48 and 72 hours, hemi-sectioned and each part decalcified in NA for 7 days or FASC (Anna Morse solution) for 35 days. A trained and blinded examiner performed the evaluation. 48

* Professor of Periodontology, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

** Professor of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Post-graduate student, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Aceito para publicação no Brazilian Oral Research.

hours of fixation and decalcification with FA showed more clear characteristics at epithelium- connective tissue interface and in periodontal structures. Mean measurements between the cementum-enamel junction and the bone crest varied from 176,5(\pm 60,45) to 210,94(\pm 39,33) pixels and in the buccal aspects from 199,69(\pm 38,33) to 298,55(\pm 70,81) pixels in the palatal sections, with no statistically significant differences (ANOVA, $\alpha=0.05$). In the same fixation period, decalcification with NA or FA did not display any statistically significant differences. It may be concluded that for the qualitative histological analysis, fixation should preferably be for 48 hours and the demineralization by FA. For the histomorphometric analysis the decalcification solution does not interfere in the results.

DESCRIPTORS: Dental research; Oral histology; Periodontal.

RESUMO: O modelo rato é extensamente usado na pesquisa periodontal e a qualidade dos cortes histológicos é essencial. A proposta deste estudo foi avaliar as características histológicas dos tecidos periodontais nas maxilas de ratos Wistar, em diferentes períodos de fixação e descalcificação pelo ácido nítrico (AN) ou pelo ácido fórmico (AF). Quinze ratos foram usados. A fixação foi realizada nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As maxilas foram divididas e parte foi descalcificada em AN durante 7 dias e parte com AF (solução de Anna Morse) por 35 dias. Um examinador treinado e cegado executou a avaliação. Quarenta e oito horas de fixação e descalcificação com AF mostraram claras características na interface epitélio-conjuntivo, assim como nas estruturas periodontais. As médias, por vestibular, entre a

junção cimento-esmalte e a crista óssea nos diferentes tempos experimentais variaram entre 176,5(± 60,45) e 210,94(± 39,33) pixels, e nas faces palatinas entre 199,69(± 38,33) e 298,55(± 70,81) pixels, sem nenhuma diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $\alpha=0.05$). Não houve diferenças significativas intra-grupo para os diferentes períodos de fixação. Pode-se concluir que, para a análise histológica qualitativa, a fixação deve ser preferivelmente em 48 horas e a desmineralização por AF. Para a análise histo-morfométrica a solução descalcificadora não interferiu nos resultados.

DESCRITORES: Histologia oral; Periodonto; Pesquisa odontológica.

INTRODUCTION

Animal models are used to investigate events associated with periodontal diseases. Wistar rats are utilized as an experimental model due to their similar characteristics to humans as well as to their similar patterns of periodontal disease development, mainly in the molar region^{5,7,12}.

Studies reporting periodontal disease in animals are not standardized regarding histological procedures such as fixation time, decalcification and type of decalcification substances used. The fixation time of the histological specimens vary, and pre-established evaluation criteria are not presented, especially concerning the relationship between the fixation method and decalcification. Nishikawa et al.¹⁰, used 10% neutral buffered formalin in 20-day-old rats for 48 hours, not informing which decalcification method was used. Chiu et al.³ used 10% formalin and 5% chloridric

acid for decalcification, not specifying the time periods. Shimizu et al.¹⁴ did not state the fixation period neither which decalcifier was used.

It is important to point out that the fixation time and decalcifying agent used are relevant to the quality of the histological sections and, consequently, to the accuracy of the research results. It is necessary that the sections preparation process be also efficient without loss of quality. Thus, Stevens et al.¹⁵ reported that the fixation process involves a series of chemical events that differ depending on the tissues to be preserved, and have as the main objective to avoid autolysis of the specimens. The use of the decalcifying agent depends on four factors: the urgency of the case, mineralization stage, the aim of the research and the staining technique to be used. All acids somehow affect tissue stability. This is dependent on the solution acidity and the time it will take to decalcify. Thus, the quicker the decalcifications the greater will be the injury and its effects on H/E¹⁵. Correa et al.⁴ reported that the decalcification process causes important molecular and morphological alterations in the tissues such as edema, vacuolation and ruptures not attributable to the pathologic condition.

Decalcifying agents are divided into strong and weak acids and chelators. The choice will depend on the way the agent affects cell elements. Small specimens can rapidly be demineralized; however, with the purpose of removing the calcium from the center of the specimens, the superficial portion will be in contact with the acid for longer periods of time. This might lead to the distortion of the specimens, reducing stability and affecting staining, especially with eosin¹⁵.

Anna Morse solution, composed of 50% formic acid and 20% sodium citrate apparently has shown the best decalcification results. The cell elements are practically

not affected, and the staining looks as if the tissues had not been submitted to the decalcification process. Frequent alterations such as the tendency to cellular edema, caused by formic acid, can be minimized by using sodium citrate¹.

Quantitative and qualitative analyses are used when examining periodontal specimens. Measurement of bone loss and attachment as well as the analysis of the sulcular epithelium characteristics, junctional epithelium, presence of inflammatory infiltrate, verification of the blastic and clastic cells require a histological evaluation of utmost quality, standardized and reproducible⁶.

Considering the need to optimize results with the fixation and decalcification of the specimens, the aim of this study was to evaluate the histological characteristics of the periodontal tissues in Wistar rat maxillae by comparing different fixation times associated with the decalcification of the specimens by means of 5% nitric acid or Anna Morse solution (50% formic acid + 20% sodium citrate)¹.

MATERIALS AND METHODS

Fifteen 60-day-old male Wistar rats were used. They were sacrificed by cervical displacement; the maxillae were removed and fixed in 10% buffered formalin for 24, 48 and 72 hours. Following sectioning of the maxilla on the median line half-maxilla was decalcified by 5% nitric acid for 7 days while the other half was decalcified in Anna Morse solution for 35 days. The specimens, around 4mm² were immersed in single vials with 15mL of acid and maintained at room temperature of around 21°C. The acid solution was changed every 24 hours, without any adjunct as vacuum agitation or heating. The decalcification process was monitored radiographically (Dabi Atlante®, Ribeirão Preto,

Brazil) and by means of an explorer. Daily, the specimens were tested with a histologic needle. The decalcified specimens were each submitted to the neutralization process with sodium bicarbonate (buffered solution for 1 hour) and then submitted to a histological processing which comprised sequentially four immersions in 95% alcohol (Pró-Cito®, Porto Alegre, Brazil) (80-minutes), one immersion in absolute alcohol (60-minutes), three immersions in xylol (Pró-Cito®, Porto Alegre, Brazil) (80-minutes) and two immersions in liquid paraffin (Biotec®, Porto Alegre, Brazil) at 60°C (120 minutes each), and at last embedment in paraffin.

Care was taken during embedment so that the mesial aspect of the first molar faced the block section plan. 3µ thick sections were sliced in a microtome (E. Leitz®, Wetzlar, Germany) until reaching the second molar. From each block, three sections were chosen, after each 20µ, evaluated by light microscopy, which should attend to the following criteria in order to be included in the study: presence of the tooth with radicular and coronary portion, cementum-enamel junction evident in at least one side, buccal or palatal, and identifiable bone crest. The sections were mounted and submitted to two xylol immersions (10 minutes each), dehydration with two absolute alcohol immersions (5 minutes each), hydration (1 minute) and staining by means of Harris Hematoxylin (Pró-Cito®, Porto Alegre, Brazil) (2 minutes) and eosin and fucsin (1 minute), sequentially followed by, quick dehydration by means of three immersions in absolute alcohol (1 minute each) and diaphanization (clarifying process) carried out in two xylol immersions (10 minutes each). Final mounting was carried out with the aid of Entelan (Merck Sharp & Dohme®, São Paulo, Brazil)⁹.

Sections were analysed by two trained examiners blinded for fixation time and type of decalcification. The analysis of the sections was performed in a optical microscope (Zeiss®,

Jena, Germany) (40x magnification) with the aim of evaluating: sulcular epithelium (intact or not); cement dislocation (absent, present at cervical third, present at medium/apical third); dentine demineralization (adequate or inadequate and whether coronal, cervical or apical); bone demineralization (adequate or inadequate).

The measurement of the distance from the cementum-enamel junction to the most coronal portion of the bone crest was carried out analyzing pictures in a transmitted light microscope (Zeiss®, Jena, Germany), attached to a camera model TK – C 620 (JVC®, Oyama, Japan) color video camera with the following specifications: standard NTCS signal system, 1/3 inch picture, 479 horizontal lines resolution on TV, 380.00 pixels 771 (H) and 490 (V), CCD picture sensor that digitalized the pictures for the Picture Analysis and Processing System - Imagelab® (Sausage, EUA), installed in a Unisys® computer (Univac, EUA).

Statistical Analysis

Differences in the variables described in the histological evaluation were tested using the Wilcoxon test. ANOVA ($\alpha=0.05$) was used to analyze differences in distance between the cementum-enamel junction and the bone crest of the experimental groups.

RESULTS

The linear evaluation of the distance between the bone crest and the cementum-enamel junction, measured in pixels, showed that for both nitric acid and Anna Morse solution, regardless of experimental times, statistically significant differences were not observed for $\alpha = 0.05$, when the buccal and palatal surfaces were compared (Table 1).

Table 2 shows the situation of the acellular cement after decalcification by Nitric Acid and Anna Morse in the different fixation times in 10% buffered formalin. No dislocation in the cervical, or in the apical and medium portion was observed. The lowest rates of dislocation occurred in the 48-hour fixation period, especially when it was performed by Anna Morse solution. Under such conditions, 73.3% of the samples did not present any displacement; however, when nitric acid was used for the same experimental period, only 23.1% did not present dislocation.

Table 3 shows the dentine demineralization pattern, in percentage values, using nitric acid and Anna Morse in the different fixation times in 10% buffered formalin. The results showed a variety of situations in the different stages of the experiment, for different decalcifiers, which did not follow a pattern. Forty eight hours was found to be the best time for nitric acid, where 38.5% of the samples were considered adequate, whereas for Anna Morse solution the fixation time did not present an established pattern.

The descriptive microscopic evaluation of the histological sections showed more uniformity in staining and better differentiation between the epithelial and connective tissues when a 48-hour fixation period and Anna Morse solution decalcification were used. At 24 hours and 72 hours periods for both nitric acid and Anna Morse solution tissues were less preserved and affinity to eosin and hematoxylin was diminished.

When the histological processing patterns were analyzed, it was noticeable that the best results obtained regarding the integrity of the sulcular epithelium were found in the 48-hour fixation period (Graphic 1).

Analysis of jaw bone decalcification pattern revealed that the best decalcification conditions were at 48-hours of fixation. Nitric Acid, in that period of time, showed the best results for demineralization (Graphic 2).

DISCUSSION

The understanding of pathogenesis of periodontal diseases is based in microscopic studies in animal models. The aim of this study was to standardize histotechnical procedures in order to minimize possible bias in this experimental phase. Our discussion, thus, is associated to microscopic quality observation of tissues involved in periodontal disease.

It is important for histological analysis that the sections are obtained with the least alterations during the entire process. However, medular and trabecular bones, and the tooth hard tissues (dentine and enamel) have different mineralization patterns. Often, epithelial and connective tissues are altered by long expositions to acids leading to degeneration. Frequently, on trying to obtain a good histological result for the calcified tissues, damage to the soft tissues, are observed. On the other hand, when the soft tissue is adequately preserved and the specimen is not completely decalcified, it is difficult to fulfill the requirements for the simultaneous analysis of mineralized and non-mineralized tissues. Fixation and decalcification techniques are routine practices in laboratories. However, in general, this routine is not questioned with regards to modifications leading to a better quality of the sections.

Studies performed in animals involving hard and soft tissues are frequently published^{2,11,13}. Without details concerning the histological processing, making this kind of discussion difficult in the literature.

It is known that the aim of fixation is to preserve tissues from autolysis and bacterial attack; also shape and volume should not be altered⁸. Among the main factors involving tissue fixation are temperature, penetration and duration. The temperature used during fixation in a histochemical process is the traditional room temperature; in warmer locations this process occurs more rapidly. The penetration phenomenon occurs relatively slowly and depends on the kind of tissue and size of specimens. Fixation time is of utmost importance in the histological process. Long periods of exposure of the specimens to the fixation agent can cause significant damage, such as oxidation, degeneration, tissue hardening and shrinking⁸.

The present study was carried out in a location where the average room temperature was about 21°C and a 24-hour routine fixation time was observed. The material comprises soft and hard tissues of about 120mm³. In this study, three fixation periods were evaluated: 24, 48 and 72 hours. The period where best results were obtained, both for soft and mineralized tissues, was 48-hours. During this period, both epithelial and connective tissues presented adequate staining.

The decalcifying agents, classified in strong and weak, are influenced by a series of factors. Among the most important, chemical substances concentration, temperature and agitation. Strong acids - commonly used in diagnostic urgencies - have a high free hydrogen ions concentration. They provoke significant alterations in the soft tissues, especially the cells. Moreover, important damages can be observed depending on the quality of the histochemical technique employed. The decalcification process can be accelerated by increasing the medium temperature and agitation. It is important to point out that all decalcification processes cause some sort of damage to the specimens^{4,8}. In our study, staining was performed in different timing always with frost solutions.

CONCLUSION

In the present study, we tried to evaluate the histological outcomes of the different fixation periods in 10% formalin using two decalcifying solutions: one strong, nitric acid, and the other weak, Anna Morse solution. It was possible to observe, regarding the distance between the cementum-enamel junction and the bone crest that both acids kept the mineralized structures without significant alterations. For the histometric analysis, the fixation time and decalcifying solution used did not alter the results. However, for the qualitative histological analysis, fixation should preferably be of 48-hours, and demineralization by Anna Morse solution.

Table 1 - Mean value (standard deviation), in pixels, of the distance between the bone crest and the cementum-enamel junction, in buccal and palatal surfaces for the different fixation periods, and decalcification.

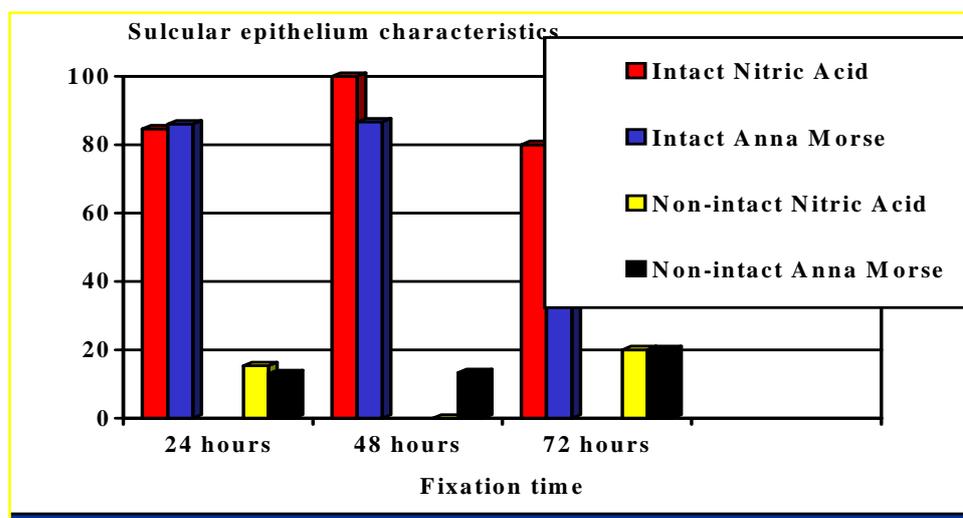
Fixation Time Decalcification	24 hours	48 hours	72 hours	p
Nitric acid Buccal	205.99 (34.20)	210.95 (39.33)	176.59 (60.45)	0,496
Anna Morse Buccal	205.21(54.77)	200.77 (45.78)	186.12 (35.73)	0,794
Nitric acid Palatal	199.69 (38.34)	254.14 (66.50)	248.83(38.71)	0,202
Anna Morse Palatal	231.39(46.55)	268.69 (69.26)	298.55 (70.82)	0,280

Table 2 - Frequency distribution of cement dislocation.

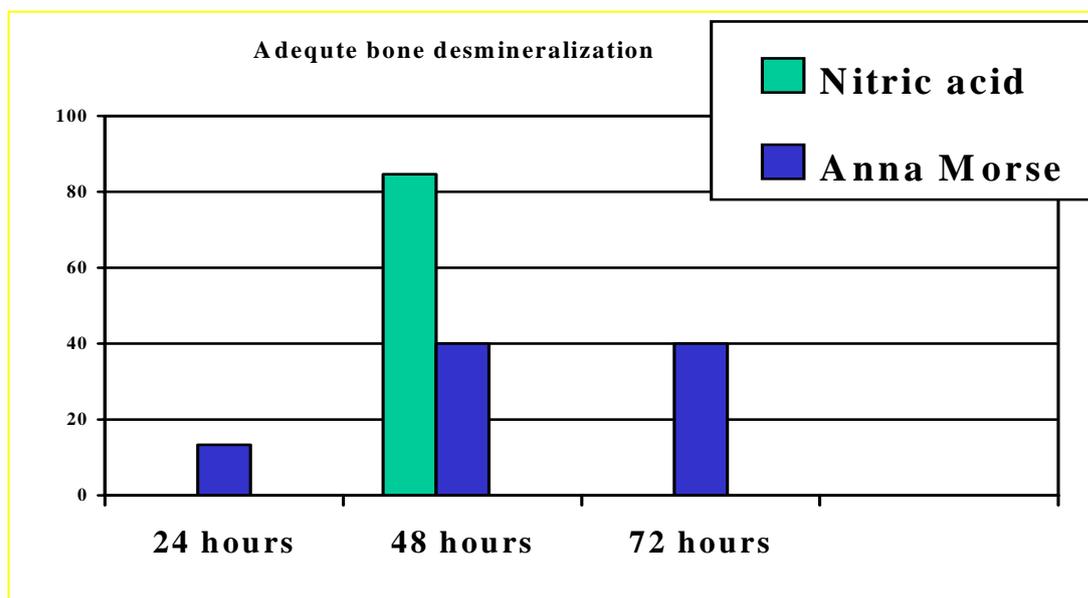
Fixation time Cementum dislocation	24 hours		48 hours		72 hours	
	Nitric acid / A. Morse		Nitric acid / A. Morse		Nitric acid / A. Morse	
Absent	0	53.3	23.1	73.3	6.7	66.7
Cervical Third	40	13.3	38.5	6.7	33.3	13.3
Apical/Mid third	60	33.3	38.5	20	60	20
p	0,006		0,015		0,014	

Table 3 - Dentine demineralization pattern (percentage) by means of nitric acid and Anna Morse in the different fixation times in 10% buffered formalin.

Fixation time Dentine demineralization	24 hours		48 hours		72 hours	
	Nitric acid/A. Morse		Nitric acid/A. Morse		Nitric acid/A. Morse	
Adequate	6.7	26.7	38.5	13.3	0	33.3
Coronary inadequate	33.3	20	23.1	40	6.7	6.7
Coronary/cervical Inadequate	20	46.7	7.7	13.3	40	6.7
Coronary/cervical/apical Inadequate	40	6.7	7.7	33.3	53.3	53.3
p	0,094		0,837		0,510	



Graphic 1 - Conditions of the sulcular epithelium (intact or not), after decalcification with nitric acid and Anna Morse in the different fixation times in 10% formalin.



Graphic 2 - Bone demineralization pattern after decalcification with nitric acid and Anna Morse in the different fixation times in 10% formalin.

REFERENCES

1. ANNA MORSE MS. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res* 1945;24:143-53.
2. CHIU GN, BALLY MB, MAYER LD. Selective protein interactions with phosphatidylserine containing liposomes alter the steric stabilization properties of poly (ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta* 2001;9;1510(1-2):56-69.
3. CHIU HC, FU E, CHIANG CY, LIU D. Does nifedipine aggravate cyclosporin-induced gingival overgrowth? An experiment in rats. *J Periodontol* 2001;72(4):532-7.
4. CORREA CR, OLIVEIRA MG, CARRARD V, LAUXEN IS, OLIVEIRA OR, BARBIERI BP, SANT'ANA FILHO M. Avaliação das alterações microscópicas em material submetido a agentes descalcificadores. In: XV Salão de Iniciação Científica 2003, Porto Alegre, p.554.
5. FITZGERALD RJ, JORDAN HV, STANLEY HR. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J Dent Res* 1960;39:923-935.
6. GAIO EJ; FERNANDES MI; OPPERMANN RV; RADOS PV; RÖSING CK Analysis morphometric and hystometric bone height in induced periodontites. Works presented in The 21st Annual Meeting of the Brazilian Society for Oral Research (8-12 September 2003).

Available from: <http://iadr.confex.com/iadr/brazil04/preliminaryprogram/abstract55977.htm>

7. HEIJL L, WENNSTRÖM J, LINDHE J, SOCRANSKY SS. Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res* 1980;15:405-419.
8. HOPWOOD, D. Fixation and fixatives. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A.; TURNER, D.R. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, 4^a ed., London, 1996. p.23-45.
9. JUNQUEIRA LCU, JUNQUEIRA LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Nobel; 1985.

10. NISHIKAWA S, NAGATA T, MORISAKI I, OKA T, ISHIDA H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol* 1996;67(5):463-71.
11. NOCITI FH JR, NOGUEIRA-FILHO GR, PRIMO MT, MACHADO MA, TRAMONTINA VA, BARROS SP, SALLUM EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* 2000;71(9):1460-4.
12. PAGE RC, SCHROEDER HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel: Karger; 1982.
13. ROVIN S, COSTICH ER, GORDON HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1966;1(3):193-204.
14. SHIMIZU Y, KATAOKA M, SETO H, KIDO J, NAGATA T. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. *J Periodontol* 2002;73(8):861-867.
15. STEVENS A, LOWE J, BANCROFT JD. Bone. *In: BANCROFT JD, STEVENS A. Theory and Practice of histological techniques. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p.309-39.*

ARTIGO III

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NIFEDIPINA SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS DE RATOS WISTAR

Marilene Issa Fernandes*

Eduardo José Gaio***

Cassiano Kuchenbecker Rösing *

Rui Vicente Oppermann*

Pantelis Varvaki Rados**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da nifedipina, sobre os aumentos de volume gengival em ratos Wistar em periodontite induzida. O estudo envolveu cinquenta ratos Wistar, divididos em 6 grupos. Dois grupos com saúde periodontal receberam administração diária 50mg/kg/dia de soro fisiológico, e outro com nifedipina 50mg/kg/dia, via sonda gástrica. Os grupos teste foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura, receberam diariamente 50mg/kg/dia de soro fisiológico ou nifedipina 10, 50 e 100 mg/kg/dia, via sonda gástrica. O processo saúde/doença periodontal foi avaliado pelos descritores etiológicos, inflamatórios e de destruição. Na ausência de ligaduras, foram observadas somente alterações histopatológicas, mas não aumento de volume gengival. Os ratos com ligadura, que receberam nifedipina 50 mg/kg/dia, mostraram na avaliação histológica, uma transformação significativa da margem gengival em uma estrutura de formato retangular. A área total do tecido conjuntivo e a área de conjuntivo inflamado se mostrou maior estatisticamente significativa, assim como a altura gengival e espessura gengival, caracterizando, desta forma

*Professor de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

**Professor de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

***Aluno do Programa de pós-graduação, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

não somente alterações histopatológicas, mas também um aumento de volume. Assim concluímos que a presença de nifedipina por si só não acarreta um aumento de volume gengival em ratos. Nessa situação, observamos discretas alterações histopatológicas. Os aumentos de volume gengival em ratos se mostraram dependes de um maior acúmulo do biofilme, associados com um padrão inflamatório bem estabelecido.

INTRODUÇÃO

O aumento de volume gengival como um efeito adverso do uso de nifedipina foi pioneiramente descrito por Lederman, Lumerman *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 a um 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. Tratamentos longos não resultam em maior aumento de volume gengival. Avaliação histológica mostrou um severo infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais de ratos infectados (Nishikawa, Nagata *et al.*, 1996).

Histologicamente, o tecido epitelial gengival associado com 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 (Morisaki, 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 do que com o uso de nifedipina (Spolidorio, 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 do biofilme é reconhecida pelo sistema de classificação das doenças periodontais como um co-fator associado à etiologia dos aumentos de volume gengival (Fu, Nieh *et al.*, 1997). No entanto, a presença do biofilme e inflamação gengival por si sós não explicam esta condição. Morisaki, 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 altura gengival, também considerada um descritor inflamatório, se mostrou maior no grupo com nifedipina, achados esses que concordam com o estudo de Ishida, 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. 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 de 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 ósseo, principalmente na ausência de um cegamento do examinador.

Desta forma, considerando a necessidade da determinação dos descritores da doença, associados tanto com a etiologia como com a situação inflamatória e de destruição dos tecidos periodontais, se faz necessário reavaliar os aumentos de volume gengival de forma sistemática, de acordo com padrões atuais de diagnóstico. Assim, o propósito do presente estudo foi estabelecer qual a repercussão histopatológica da nifedipina em situação de saúde e periodontite sobre o processo saúde/doença baseado em descritores que claramente avaliem o efeito da nifedipina sobre os tecidos periodontais.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a realização deste estudo, foram utilizados 50 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade e peso variando entre 144 e 170g no momento experimental.

Os animais foram divididos em 6 grupos que receberam ração padronizada e água *ad libitum*. Dois grupos, com dez ratos cada, foram considerados controle. Um grupo com administração diária 50ml/kg/dia de soro fisiológico, e outro com nifedipina 50mg/kg/dia (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* 2003), via sonda gástrica. Os grupos teste foram submetidos a modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005). Dez ratos receberam diariamente 50ml/kg/dia de soro fisiológico e outros dez receberam nifedipina 50mg/kg/dia (Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* 2003), via sonda gástrica. Para testar diferenças de dosagem, para cinco ratos foi administrada nifedipina 10mg/kg/dia (Chiu, Fu *et al.*, 2001) e para outros cinco nifedipina 100mg/kg/dia, via sonda gástrica. Durante o período experimental de 30 dias, a dosagem administrada foi ajustada semanalmente de acordo com o peso.

Os ratos foram mortos em câmara de CO₂ e, imediatamente após as maxilas foram removidas e fixadas em formalina tamponada 10%, por um período de 48

horas. Após fixação, as peças foram submetidas ao processo de descalcificação por solução de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%) durante 40 dias aproximadamente (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 colocada paralela ao solo de forma que ficasse perpendicular ao plano de corte do bloco. Os cortes foram realizados no sentido vestibulo/lingual, em micrótomo^{*****} com 5µm de espessura, até alcançar a região contendo as raízes em seu longo eixo. Cada bloco deu origem a três cortes, coletados a cada 20µm de avanço.

Análise histológica descritiva

A análise histológica descritiva foi realizada por dois examinadores em um microscópio binocular óptico⁺⁺⁺⁺⁺⁺⁺ com aumento de 40 vezes. Foram avaliados o aspecto do epitélio interno, juncional e sulcular, e o epitélio bucal e suas características, como a presença de cristas epiteliais, ceratina, espaços intercelulares e degeneração hidrópica. No tecido conjuntivo, a análise envolveu a presença de alterações inflamatórias e celulares. A relação da base do epitélio juncional com a junção amelo-cementária, o ligamento periodontal, cimento e osso alveolar também foram observados.

Análise Histológica Quantitativa

Para a análise quantitativa, os cortes histológicos foram visualizados em um microscópio óptico com aumento de 40 vezes. As imagens foram então digitalizadas por meio de fotografias realizadas com uma máquina digital de 4 megapixels⁺⁺⁺⁺⁺⁺⁺ com distância focal de 4 vezes e velocidade de 1/60, acoplada à lente do microscópio. Para fins de conversão dos resultados de medição, foi fotografada uma

***** RM2155, E. Leitz®, Wetzlar, Germany
+++++++ Zeiss®, Jena, Germany
+++++++ Nikon® Coolpix, Ayuthaya, Thailand

escala microscópica calibradora^{§§§§§§§§} de medida conhecida na mesma objetiva. Os campos utilizados para esta avaliação respeitavam os seguintes critérios: presença da porção coronária e radicular do segundo molar, junção amelo-cementária evidente e crista óssea passível de identificação. Também o tecido epitelial sulcular, juncional e bucal e tecido conjuntivo não deveriam ter alterações decorrentes do processamento histológico.

Mensurações lineares e de área foram realizadas por um único examinador que desconhecia a relação da lâmina com o seu grupo experimental. A área do epitélio interno considerava a área do epitélio juncional de sua porção mais apical até a porção mais coronária e marginal do epitélio sulcular, que claramente dividia a área em epitélio interno e epitélio bucal. A área do epitélio bucal considerava a área mais coronária do epitélio bucal que claramente dividia a área em epitélio bucal e epitélio interno, se estendendo apicalmente até a altura correspondente à base do epitélio juncional. A área do tecido conjuntivo gengival total considerava toda a área de conjuntivo gengival até a porção mais apical do infiltrado inflamatório relacionada com a base do epitélio juncional. A área de tecido conjuntivo inflamado correspondia a toda a área de tecido conjuntivo gengival inflamado, apresentando alterações vasculares e acúmulo de células inflamatórias. As medidas lineares realizadas foram de perda óssea, correspondendo a distância da junção amelo-cementária até à crista óssea, a espessura gengival foi da junção amelo-cementária até a porção mais distante do epitélio bucal e a altura gengival da base do epitélio juncional até a margem gengival.

- 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

^{§§§§§§§§} E. Leitz®, Wetzlar, Germany

significância estatística foi corrigida para múltiplas comparações usando o método de Bonferroni.

RESULTADOS

No grupo com ligadura, um rato foi excluído em decorrência de um seqüestro ósseo junto à margem gengival, ficando este grupo com nove ratos. O grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia, perdeu um rato devido ao processamento histológico da peça o que também ocorreu no grupo ligadura com nifedipina 10mg/kg/dia.

Análise histológica descritiva

Na avaliação microscópica (Figura 1) o grupo experimental controle com nifedipina 50mg/kg/dia, mostrou em quatro de nove animais um epitélio interno mais espesso não permitindo uma diferenciação óbvia entre epitélio juncional e sulcular. O epitélio juncional se manteve com a base na junção amelo-cementária. O grupo com ligadura mostrou em todos os animais perda de inserção microscopicamente, já que a base do epitélio juncional se encontrava em posição apical à junção amelo-cementária. O epitélio da bolsa mostrava papilas coriáceas em pontos variáveis da sua extensão e sinais de degeneração hidrópica. Outro detalhe a ser ressaltado foi o aumento da espessura da camada de ceratina em relação aos grupos controle e controle com nifedipina 50mg/kg/dia. O epitélio bucal apresentava cristas epiteliais mais longas quando comparado aos grupos anteriores. O infiltrado inflamatório crônico se estendia de maneira mais difusa no conjuntivo gengival. Os ratos com ligadura que receberam nifedipina 50mg/kg/dia tiveram como característica morfológica mais significativa a transformação da margem gengival em uma estrutura de formato retangular com a criação de um “plateau” de tecido. Essa mudança do formato gengival se deveu principalmente ao crescimento do tecido conjuntivo. Este tecido apresentava infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário mais concentrado na vertente interna da bolsa, mas se estendendo até o epitélio bucal. O epitélio externo apresentou projeções epiteliais abundantes e profundas.

O grupo com ligadura que recebeu nifedipina 10mg/kg/dia se apresentava semelhante ao grupo com ligadura, enquanto que o grupo com ligadura e nifedipina 100mg/kg/dia foi semelhante ao grupo que recebeu 50mg/kg/dia, revelando as características microscópicas de maneira mais extensa .

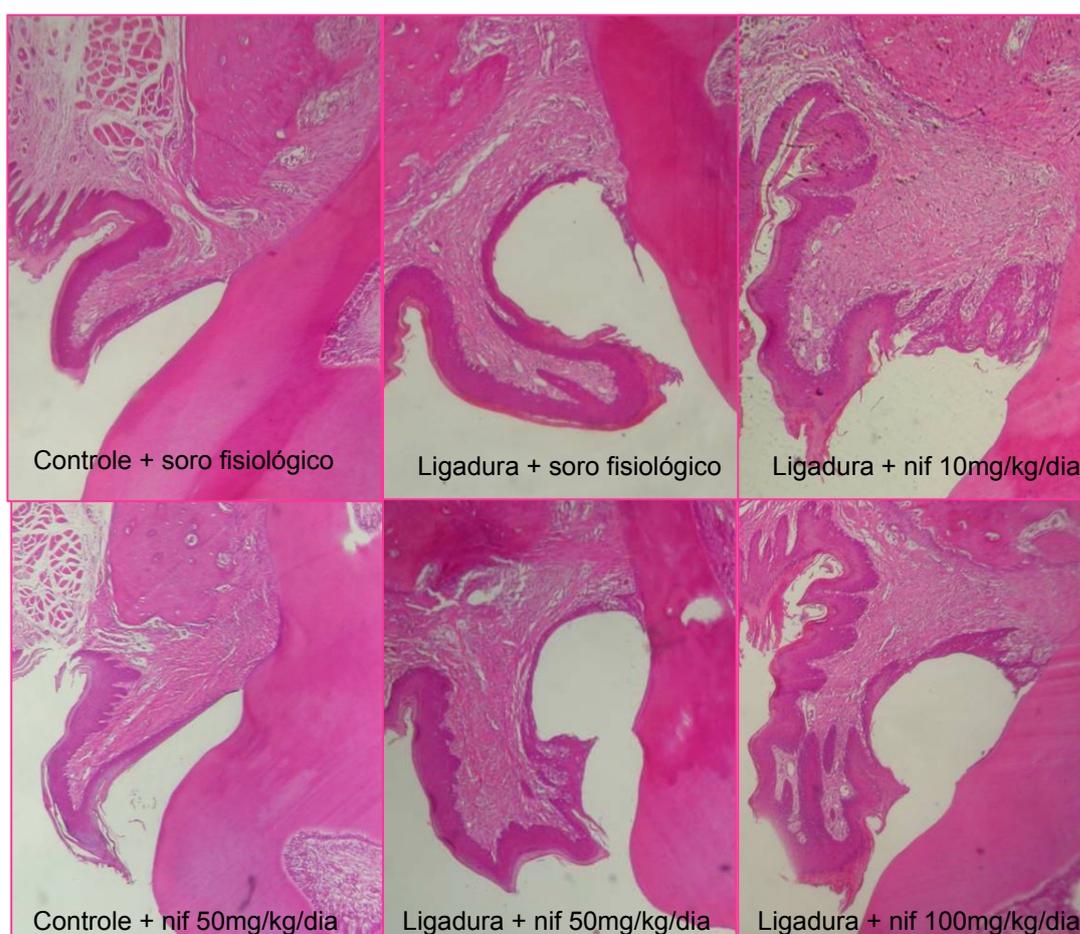


Figura 1 – Cortes histológicos corados com HE, dos grupos experimentais: grupos controle com soro fisiológico e nifedipina 50 mg/kg/dia e grupos teste: ligadura com soro fisiológico, ligadura com nifedipina 50 mg/kg/dia, ligadura com nifedipina 10 mg/kg/dia e ligadura com nifedipina 100mg/kg/dia.

Análise histológica quantitativa

As medidas de área são semelhantes estatisticamente entre os ratos do grupo controle que receberam ou não nifedipina 50mg/kg/dia (Tabela 1). Entre os ratos com ligadura que receberam ou não nifedipina 50mg/kg/dia de peso, houveram diferenças significativas em relação à área de epitélio interno, que para o grupo que recebeu a medicação foi 57% maior. O tecido conjuntivo total teve um aumento de 70% em sua área, enquanto que o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório mostrou um aumento de 65%, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Assim, a administração de nifedipina associada a uma acumulação de biofilme subgingival levou a uma maior área de epitélio interno e tecido conjuntivo, associada com um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. A área do epitélio bucal se mostrou semelhante entre os dois grupos.

Grupos	Epitélio interno	Epitélio bucal	Conjuntivo total	Conjuntivo inflamado
Controle	18479,60 a (5231,80)	31890,22 a (9117,38)	38178,63 a (11596,30)	8764,54 a (2442,46)
Controle c/ nif 50mg/kg	16782,64 a (4025,45)	31359,23 a (8514,91)	38505,61 a (10897,00)	7888,72 a (1766,13)
Ligadura	37576,38 b (11917,42)	54098,13 b (18286,19)	82621,53 b (29472,43)	26645,22 b (7223,64)
Ligadura com nif 50mg/kg	60798,50 c (12036,67)	66014,44 b (29780,29)	118213,00 c (16341,34)	40510,53 c (9632,50)

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das medidas de área em μm^2 . Médias seguidas de letras diferentes, entre os grupos com ou sem nifedipina (nif), mostram diferença estatisticamente significativa.

As medidas lineares entre os grupos controle e controle com nifedipina são semelhantes entre si (Tabela 2). Para os grupos ligadura e ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia pôde se observar diferenças significativas estatisticamente em relação à altura gengival e espessura da gengiva. A altura gengival aumentou 75% e a espessura gengival 80%. Em relação à distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea, no grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg houve uma maior perda óssea, aproximadamente 18%, que estatisticamente foi semelhante entre os dois grupos para esse período experimental.

Grupos	JAC / crista óssea	Espessura	Altura gengival
Controle	222,02 a (29,51)	386,07 a (54,42)	441,34 a (58,98)
Controle c/ nif 50mg/kg	217,57 a (26,96)	387,50 a (65,20)	438,61 a (68,02)
Ligadura	503,58 b (122,46)	566,40 b (96,26)	503,86 b (122,19)
Ligadura c/ nif 50mg/kg	562,13 b (55,44)	712,25 c (81,39)	667,91 c (90,96)

Tabela 2 – Medidas lineares e desvio-padrão em μm . Médias seguidas de letras diferentes, entre os grupos com ou sem nifedipina (nif), mostram diferença estatisticamente significativa.

O gráfico 1 mostra a área do epitélio interno, epitélio bucal conjuntivo total e conjuntivo inflamado. Foram considerados os grupos que receberam ligadura com dosagens de nifedipina de 10mg/kg/dia, 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, comparados com o grupo ligadura. O epitélio interno aumentou sua área gradualmente dos grupos

com 10mg/kg/dia para 50mg/kg/dia, já a área na dosagem de 100mg/kg/dia ficou semelhante ao grupo de 10mg/kg/dia. No entanto, o epitélio bucal manteve um aumento gradual de acordo com a dosagem. A área do conjuntivo total variou entre os grupos conforme a dosagem de nifedipina.

As medidas lineares, considerando os grupos que receberam ligadura com dosagens de nifedipina de 10, 50 e 100mg/kg/dia, comparados com o grupo ligadura são mostradas no gráfico 2. A distância da junção amelo-cementária até a crista óssea aumentou em relação ao grupo ligadura e grupo ligadura com nifedipina 50mg/kg/dia, se mantendo estável em relação ao grupo ligadura com nifedipina 100mg/kg/dia. O mesmo ocorreu em relação à espessura e altura gengival.

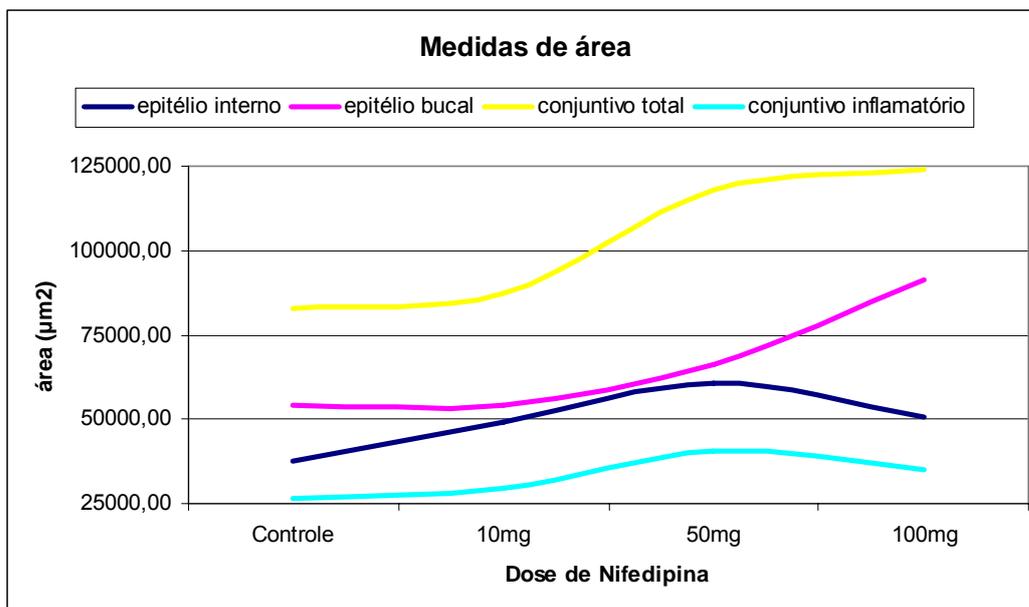


Gráfico 1 – Medidas de área em μm^2 . Grupos controle e teste com ligadura e diferentes dosagens de nifedipina.

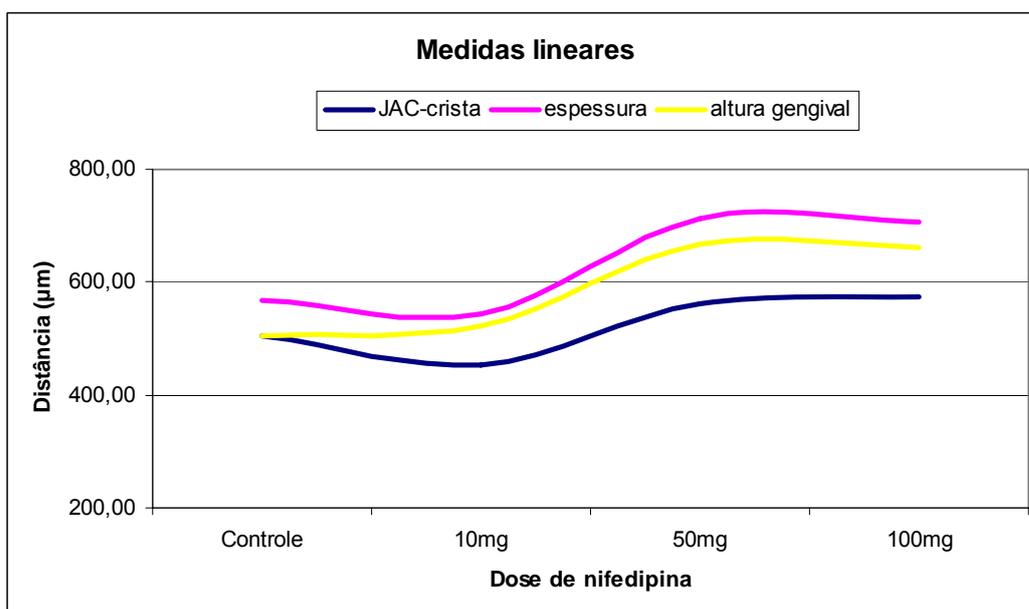


Gráfico 2 – Medida linear em μm , considerando os grupos controle e teste com ligadura e diferentes dosagens de nifedipina.

DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo avaliar a ação da nifedipina, administrada por via oral, sobre os tecidos periodontais em ratos Wistar machos. Os resultados mostraram que em uma gengiva clinicamente saudável a administração de nifedipina por via oral, 50 mg/kg/dia, não desencadeou aumento de volume gengival. Por outro lado, quando a periodontite foi induzida, e nifedipina administrada em uma dosagem de 50mg/kg/dia, houve aumento de volume gengival visto pelo aumento na espessura gengival, área de tecido conjuntivo e epitelial, além da altura gengival.

Estes resultados diferem daqueles descritos na literatura, pela sistematização da avaliação dos descritores etiológicos, inflamatórios e de destruição que permitiram mostrar o efeito da nifedipina sobre os aumentos de volume gengival de acordo com os padrões atuais de diagnóstico periodontal.

Na avaliação histológica descritiva (Figura 1), este estudo mostrou que quatro dentre os nove ratos, que receberam nifedipina 50 mg/kg/dia, apresentaram um epitélio interno sem uma diferenciação óbvia entre epitélio juncional e sulcular, caracterizado como discreta hiperplasia epitelial. Estes resultados histologicamente são semelhantes a estudos que observaram tecido epitelial hiperplásico, com cristas epiteliais longas no epitélio sulcular, sem alterações no epitélio juncional (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Kataoka, Shimizu *et al.*, 2001; Shimizu, Kataoka *et al.*, 2002). Estas alterações histológicas não determinaram diferenças na área do epitélio interno. No entanto, estudos que mediram, de forma linear e pontual, ou mesmo visual, a espessura do tecido epitelial, encontraram diferenças estatisticamente significativas (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Kataoka, Shimizu *et al.*, 2001; Shimizu, Kataoka *et al.*, 2002; Spolidorio, Spolidorio *et al.*, 2002). Saito *et al.*, 2002, também observaram, em espécimes humanos, um aumento na espessura epitelial. As diferenças entre os resultados se devem principalmente à forma de avaliação, pois na maioria dos estudos não foi realizado cegamento do examinador quanto aos grupos experimentais. Em outros, as diferenças de espessura são observadas qualitativamente o que torna difícil uma comparação dos resultados.

A altura gengival, avaliada em cortes histológicos, nos ratos que receberam nifedipina 50mg/kg/dia, não mostrou diferenças significativas. Morisaki, Kato *et al.* (1993) e Ishida, Kondoh *et al.* 1995 avaliaram a profundidade de sondagem clinicamente, sob um microscópio estereoscópico, e observaram diferenças estatisticamente significativas. A comparação desses resultados com os do presente estudo é limitada, pois os autores utilizam um modelo de mensuração da profundidade de sondagem que pode ser alterado por diferentes fatores (Bulthuis, Barendregt *et al.*, 1998; Garnick e Silverstein, 2000).

O infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário no grupo que recebeu nifedipina 50 mg/kg/dia acompanhava paralelamente o epitélio interno, não ocorrendo diferenças significativas na área do tecido conjuntivo total ou inflamado em relação ao grupo sem nifedipina. Esses resultados são semelhantes a outros estudos em animais que observaram poucas células inflamatórias no conjuntivo subepitelial. No entanto, diferem em relação ao aumento de volume gengival que alguns estudos mostram ter ocorrido mesmo na ausência de inflamação (Morisaki, Kato *et al.*, 1993; Kataoka, Shimizu *et al.*, 2001). Estudos em humanos com aumento de volume gengival, pela administração de nifedipina, mostraram graus variáveis de infiltrado inflamatório, não relacionando com a situação periodontal (Barak, Engelberg *et al.*, 1987).

No presente estudo, as maiores alterações foram observadas entre os grupos onde a periodontite foi induzida pelo uso de ligaduras, favorecendo uma maior acumulação do biofilme subgengival.

Os ratos com ligadura, que receberam nifedipina 50 mg/kg/dia, mostraram na avaliação histológica descritiva (Figura 1), uma transformação significativa da margem gengival em uma estrutura de formato retangular, característica de aumento de volume gengival. Essa mudança, em nossa opinião, se explica principalmente pelo crescimento de tecido conjuntivo. A diferenciação morfológica entre epitélio juncional e sulcular estava perdida. O epitélio interno mostrava papilas coriais em pontos variáveis da sua extensão, sinais de degeneração hidrópica e a medida da área significativamente maior. O epitélio bucal apresentava cristas epiteliais mais longas quando comparado aos grupos anteriores. O infiltrado inflamatório crônico

acompanhava a parede do revestimento epitelial e já se estendia de maneira mais difusa para o interior do tecido conjuntivo. Neste grupo, tanto a área total do tecido conjuntivo como a área de conjuntivo inflamado se mostrou maior estatisticamente significativa, assim como a altura gengival e espessura gengival, caracterizando, desta forma, não somente alterações histopatológicas, mas também um aumento de volume.

Poucos estudos em animais estão relacionados com periodontite. Fu, Nieh *et al.*, 1997, avaliaram em ratos o efeito da ciclosporina comparando um lado com ligadura com o contralateral sem ligadura. Os resultados mostraram que dentes com ligadura apresentavam um aumento estatisticamente significativo no volume dos tecidos epitelial e conjuntivo total, assim como no infiltrado inflamatório e tecido gengival total. Observaram assim, um aumento de volume gengival óbvio nos dentes com ligadura.

Estudos em humanos também observaram ser as variáveis periodontais, principalmente o biofilme e a inflamação gengival, importantes fatores de risco para a expressão dos aumentos de volume gengival (Bullon, Machuca *et al.*, 1995; Tavassoli, Yamalik *et al.*, 1998).

Nesse estudo todos os animais apresentaram perda de inserção microscopicamente. O grupo que recebeu nifedipina 50mg/kg/dia teve uma perda óssea 18% maior, ainda que esses valores sejam estatisticamente semelhantes. Gonçalves, Nogueira Filho *et al.* (2003) quantificaram o volume de perda óssea na região da bifurcação observando 13% mais perda, não sendo esta diferença significativa entre os grupos. Shen *et al.*, 2001, avaliando o efeito da ciclosporina sobre o osso alveolar em ratos observaram diferenças significativas no volume ósseo alveolar, mas não na área do osso alveolar.

O grupo com ligadura que recebeu nifedipina 10mg/kg/dia foi semelhante ao grupo com ligadura sem medicação, enquanto o grupo com ligadura e nifedipina 100mg/kg/dia foi semelhante ao grupo que recebeu 50mg/kg/dia, revelando as características microscópicas de maneira mais extensa. Estes resultados confirmaram os achados de Chiu, Fu *et al.* (2001), que compararam dosagens de 10

e 50mg/kg/dia e encontraram diferenças somente quando a dosagem de nifedipina foi maior.

Desta forma, podemos concluir que a presença de nifedipina por si só não acarreta um aumento de volume gengival em uma situação de saúde periodontal em ratos. Nesta situação podemos observar somente discretas alterações histopatológicas vistas no epitélio interno, como a ausência de diferenciação entre epitélio juncional e sulcular. Os aumentos de volume gengival em ratos se mostraram dependentes de um padrão inflamatório bem estabelecido, mostrado tanto pelo aumento do infiltrado inflamatório como pelo aumento da espessura e altura gengival.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Barak, S., I. S. Engelberg, *et al.* Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings. J Periodontol, v.58, n.9, Sep, p.639-42. 1987.

Bullon, P., G. Machuca, *et al.* Clinical assessment of gingival size among patients treated with diltiazem. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.79, n.3, Mar, p.300-4. 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.

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.

Chiu, H. C., E. Fu, *et al.* Does nifedipine aggravate cyclosporin--induced gingival overgrowth? An experiment in rats. J Periodontol, v.72, n.4, Apr, p.532-7. 2001.

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.

Garnick, J. J. e L. Silverstein. Periodontal probing: probe tip diameter. J Periodontol, v.71, n.1, Jan, p.96-103. 2000.

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.

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.

Kataoka, M., Y. Shimizu, *et al.* Nifedipine induces gingival overgrowth in rats through a reduction in collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. J Periodontol, v.72, n.8, Aug, p.1078-83. 2001.

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.

Morisaki, I., K. 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.

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.

Saito, K., Mori, S., *et al.*, Immunolocalization of c-Myc and bcl-2 proto-oncogene products in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. J Periodontol, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2000.

Shen, E., Fu, E. *et al.*, Effects of cyclosporin A on dental Alveolar bone: A histomorphometric study in rats. J. Periodontol, v. 72, p. 659-665, 2001.

Shimizu, Y., M. Kataoka, *et al.* Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. J Periodontol, v.73, n.8, Aug, p.861-7. 2002.

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.

Tavassoli, S., N. Yamalik, *et al.* The clinical effects of nifedipine on periodontal status. J Periodontol, v.69, n.2, Feb, p.108-12. 1998.