

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRESSA ARAÚJO SWERTS

**AÇÃO DA LASERTERAPIA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA – ESTUDO
BIOQUÍMICO E RADIOGRÁFICO**

ALFENAS/MG

2014

ANDRESSA ARAÚJO SWERTS

**AÇÃO DA LASERTERAPIA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL
INDUZIDA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA – ESTUDO
BIOQUÍMICO E RADIOGRÁFICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

ALFENAS/MG

2014

Swerts, Andressa Araújo.

Ação da laserterapia na periodontite experimental induzida em ratos tratados com sinvastatina – estudo bioquímico e radiográfico / Andressa Araújo Swerts - Alfenas, 2014.
60 f. -

Orientador: Leandro Araújo Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Estresse oxidativo. 3. Pedra óssea alveolar. 4. Sinvastatina. 5. Lasers. I. Fernandes, Leandro Araújo. II. Título.

CDD: 617.632



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1392 . Fax: (35) 3299-1067



ANDRESSA ARAÚJO SWERTS

**“AÇÃO DA LASERTERAPIA NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL INDUZIDA
EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA – ESTUDO BIOQUÍMICO E
RADIOGRÁFICO”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 21/02/2014

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: Leandro Araújo Fernandes

Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida
Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP/Araçatuba

Assinatura: Juliano Milanezi de Almeida

Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: Alessandro Antônio Costa Pereira

Dedico este trabalho a Deus, que sempre guiou meus caminhos, aos meus pais pelos ensinamentos e ao meu esposo pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Leandro Araújo Fernandes, por todos ensinamentos científicos e por sempre me lembrar que devemos ter calma e paciência, pois tudo se encaminha.

À prof^ª. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, pelos conhecimentos transmitidos de maneira constante, pela paciência e confiança.

À Simone Ribeiro Bruzadelli pela amizade sincera, convívio e pelos momentos de trabalho neste mestrado.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Professor João Adolfo Costa Hanemman, por sua dedicação ao Curso e gosto pela docência.

A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, pela ajuda e atenção.

A Capes pela concessão de Bolsa de Estudo.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do laser em baixa intensidade (LLLT) como coadjuvante ao tratamento não cirúrgico da doença periodontal (DP) experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com Sinvastatina. Setenta e oito ratos foram divididos em 2 grupos de 36 animais cada. Os do Grupo Controle (C) receberam administração via oral de polietileno glicol 400; os do Grupo Sinvastatina (S) receberam administração via oral de Sinvastatina, realizada uma vez ao dia e iniciadas 1 dia antes da indução da DP, continuando pós tratamento periodontal até os respectivos períodos de eutanásias. A DP foi induzida através da colocação de ligadura com fio de algodão na região dento - gengival. Após 7 dias da indução, a ligadura foi removida e, os animais dos grupos C e S foram divididos em subgrupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: Raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico (R); R seguido da aplicação do LLLT (GaAlAs, 660 nm, 4J) (RL). Seis animais de cada subgrupo foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamentos locais. Amostras de biópsias gengivais da região com ligadura foram processadas para mensuração de danos oxidativos teciduais, analisando o teor do tripeptídeo glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA), produto final da lipoperoxidação, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, a ocorrência de proteínas carboniladas (CPO), estimada através de reação com dinitrofenilhidrazina. As mandíbulas foram seccionadas para análise radiográfica. O efeito antioxidante da Sinvastatina foi melhor observado na mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). O malondialdeído (MDA) não funcionou como um bom marcador de estresse oxidativo neste modelo experimental, o teor de proteínas carboniladas (CPO) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no grupo controle. Além disso, observou-se na análise radiográfica que a associação com laserterapia diminuiu ($p < 0,01$) o nível de perda óssea na superfície mesial dos dentes com periodontite experimental. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o RL e a Sinvastatina foram efetivos como tratamentos coadjuvantes à R, protegendo a ocorrência de danos oxidativo teciduais, e reduzindo a perda óssea em periodontite experimentalmente induzida em ratos.

Palavras-chaves: Periodontite. Estresse Oxidativo. Perda Óssea Alveolar. Sinvastatina. Lasers.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of low intensity laser (LLLT) as an adjunct to non-surgical treatment of periodontal disease (PD) experimentally induced in rats treated or not with simvastatin. Seventy-eight rats were divided into 2 groups of 36 animals each. Control group (C) received oral administration of polyethylene glycol 400, while simvastatin group (S) received oral administration of simvastatin. Both treatments started once a day before the induction of DP, continuing until respective periods of euthanasia. The DP was induced by placing cotton ligature in the supragingival region. After 7 days, the ligature was removed, the animals from both groups were divided into subgroups according to the following local treatments: Scaling and root planning (SRP) and irrigation with saline (R); R followed by application of LLLT (GaAlAs, 660 nm, 4J) (RL). Six animals of each group were euthanized at 7, 15 and 30 days post treatment. Samples of gingival tissues from ligature regions were processed for measurement of oxidative tissue damage by analyzing the content of the tripeptide glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), the end product of lipoperoxidation by means of high performance liquid chromatography (HPLC), and the occurrence of protein carbonyls content (PCO), estimated by reaction with dinitrophenylhydrazine. The mandibles were sectioned for radiographic analysis. The antioxidant effect of Simvastatin was best observed in the measurement of reduced glutathione (GSH) levels. The malondialdehyde (MDA) does not work as a good marker of oxidative stress in this experimental model, the content of carbonylated protein (PCO) increased significantly ($p < 0,05$) in the control group. In addition, it was observed during radiographic analysis that combination with laser therapy decreases ($p < 0,01$) the bone loss level on the mesial surface of teeth with experimental periodontitis. Restricted to these experimental conditions, the results pointed out to major efficacy of RL and simvastatin concerning to minimize oxidative damage to gingival tissue, and to reducing periodontitis-associated bone loss in rats.

Keywords: Periodontitis. Oxidative Stress. Alveolar Bone Loss. Simvastatin. Lasers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Delineamento do estudo	27
FIGURA 2 -	Animal posicionado na mesa operatória	28
FIGURA 3 -	Pinça modificada utilizada para a passagem do fio	28
FIGURA 4 -	Posicionamento do fio	28
FIGURA 5 -	Fio posicionado	28
FIGURA 6 -	Doença periodontal após 7 dias de indução	29
FIGURA 7 -	Raspagem e alisamento radicular	29
FIGURA 8 -	Aplicação do laser em baixa intensidade	29
FIGURA 9 -	Cromatograma característico de detecção de GSH, no padrão, após derivatização com mBBr	34
FIGURA 10 -	Cromatograma característico de detecção de GSH, na amostra, após derivatização com mBBr	35
FIGURA 11 -	Cromatograma característico de detecção de MDA, no padrão, após derivatização com TBA	37
FIGURA 12 -	Cromatograma característico de detecção de MDA, na amostra, após derivatização com TBA	37
FIGURA 13 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C que receberam o tratamento de RAR. Período de 7, 15 e 30 dias	40
FIGURA 14 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C que receberam o tratamento de RAR/LIB. Período de 7,15 e 30 dias	41
FIGURA 15 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo S que receberam o tratamento de RAR. Período de 7,15 e 30 dias	42
FIGURA 16 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo S que receberam o tratamento de RAR/LIB. Período de 7,15 e 30 dias	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Efeito da administração oral de Sinvastatina sobre o conteúdo de glutatona reduzida em amostras gengivais. Periodontite foi induzida por ligadura e GSH foi doseada através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=394nm$; $\lambda_{emi}=490nm$) após reação com monobromobimano	36
TABELA 2 -	Efeito da sinvastatina sobre lipoperoxidação decorrente de periodontite induzida. A ocorrência de danos oxidativos em lipídeos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=515nm$; $\lambda_{emi}=553nm$) para detecção do aduto MDA-ácido tiobarbitúrico.	38
TABELA 3 -	Efeito da sinvastatina em danos oxidativos em proteínas induzidos por periodontite experimental. O conteúdo de carbonilas proteicas foi determinado em amostras gengivais através de análise espectrofotométrica ($\lambda=370 nm$; $\epsilon=22.000 M^{-1}.cm^{-1}$)	39
TABELA 4 -	Médias e desvios padrões ($M\pm DP$) das distâncias entre a união cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP -	Adenosina trifosfato
BMP-2 -	Proteína morfogenética tipo 2
BSA -	Albumina sérica bovina
CEUA -	Comissão de ética no uso de animais
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEA -	Colégio brasileiro de experimentação animal
CPO -	Proteínas carboniladas
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DNPH -	2,4 - dinitrofenilhidrazina
DP -	Doença periodontal
ERO/ERN -	Espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio
GaAIs -	Arseneto de Gálio – Alumínio
Grupo C -	Grupo Controle
Grupo S -	Grupo Sinvastatina
GSH -	Tripeptídeo glutationa
HMG-CoA	3 – hidroxil – 3 – metil – glutaril – coenzima A
IL -	Interleucinas
iNOS -	Óxido nítrico sintase induzível
LASER -	Light amplification by stimulated emission of radiation
LBI -	Lasers em baixa intensidade

mBBr -	Monobromobimanio – 3,7 – dimetil – 4 – bromometil – 1,5 – diazobíclco [3.3.0] octa – 3,6 – dieno – 2,8 - diona
MDA -	Malondialdeído
MPO -	Mieloperoxidase
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
Nox2 -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido – isoforma 2
PO -	Perda óssea
RAR -	Raspagem e alisamento radicular
RAR/LIB -	Raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico, laser em baixa intensidade
RNA_m -	Ácido ribonucleico mensageiro
Se-Gpx -	Glutathiona peroxidase
SOD -	Superóxido dismutase
TBA -	Ácido tiobarbitúrico
TCA -	Ácido tricloroacético
TNF - α	Fator de necrose tumoral α
γGlu-Cys-Gli -	Tripeptideo glutathiona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL.....	15
2.2	PERIODONTITE EXPERIMENTAL.....	16
2.3	DOENÇA PERIODONTAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
2.4	MÉTODOS COADJUVANTES NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE.....	20
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ANIMAIS.....	26
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	26
4.3	INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL.....	27
4.4	TRATAMENTO LOCAL.....	28
4.5	PERÍODOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS GENGIVAIS.....	30
4.6.1	Determinação da concentração proteica total.....	30
4.6.2	Determinação do tripeptídeo glutationa.....	30
4.6.3	Determinação de malondialdeído.....	31
4.6.4	Determinação de proteínas carboniladas.....	31
4.7	TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL.....	32
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	DOSAGEM DE GSH EM AMOSTRAS GENGIVAIS.....	34
5.2	TEOR DE MDA EM TECIDOS GENGIVAIS.....	36
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE CPO.....	38
5.4	ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	40
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO *

A doença periodontal é o resultado da destruição dos tecidos de suporte do elemento dental pela ação local de microrganismos periodontopatógenos. Esses microrganismos liberam substâncias que agriem diretamente os tecidos periodontais e induzem à destruição tecidual por respostas inflamatórias e imunológicas do próprio hospedeiro (KAMMA; SLOTS, 2003; BREIVK et al., 2006).

As primeiras células de defesa que migram para o sítio inflamatório são os neutrófilos, que têm como principal função realizar a fagocitose dos microrganismos. A medida que o processo de fagocitose ocorre, pode-se evidenciar uma série de alterações metabólicas no interior do neutrófilo, como aumento do metabolismo glicolítico e do consumo de oxigênio. Além disso, evidencia-se a produção de diversas espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, bem como a degranulação lisossômica e a ativação de isoformas de metaloproteinases de matriz. Entretanto, alguns desses constituintes podem escapar do fagolisossomo e, desencadear a destruição dos tecidos de suporte do elemento dentário (LINDHE et al., 2010).

O tratamento da doença periodontal baseia-se na eliminação da microbiota subgingival patogênica pela raspagem e alisamento radicular (RAR) (LISTGARTEN, 1975; KALDAHL et al., 1993). Entretanto, a terapia mecânica utilizada isoladamente pode ser falha na eliminação de bactérias patogênicas por localizarem-se no interior dos tecidos moles, duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como áreas de furca e depressões radiculares (ADRIAENS et al., 1988; MATIA et al., 1986).

Devido a essas limitações, métodos coadjuvantes que promovam a eliminação de patógenos periodontais têm despertado o interesse de pesquisadores que consideram o uso de antibióticos ou antissépticos efetivos no tratamento periodontal (RAMS; SLOTS, 1996). Por outro lado, a literatura evidencia também pesquisas que demonstram a seleção e resistência bacteriana promovida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica periodontal (GAD et al., 2004; KÖMERIK, 2003).

Desde 1992, o uso dos lasers para o tratamento da doença periodontal tem sido relatado (MIDDA, 1992; COBB, 2006). Os lasers em baixa intensidade (LBI) mais utilizados em odontologia são os de diodo de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) (RIBEIRO, 2000). Esses lasers foram concebidos com o objetivo de promover redução bacteriana e debridamento sulcular, a fim de desinfetar as bolsas periodontais

* Normas segundo o Manual de normatização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG.

(ANDREANA, 2005; CASTRO et al., 2006) devido às limitações relacionadas ao tratamento convencional de RAR. Mas também destacam-se as funções de alterar níveis de ATP celular, favorecer a liberação de fatores de crescimento, estímulo de fibroblastos na síntese de fibras colágenas mais organizadas, favorecendo o processo de reparação tecidual (POSTEN et al., 2005).

Considerando o papel proeminente do hospedeiro como principal componente da destruição de tecidos moles e duros vista na periodontite, estratégias terapêuticas, como a modulação farmacológica da resposta do hospedeiro, têm se sobressaído como uma nova abordagem de tratamento (BUDUNELI et al., 2007).

As estatinas são drogas utilizadas no controle de dislipemia (JUNQUEIRA et al., 2002; KRONMANN et al., 2007). Todavia, além desta função hipolipemiante, algumas estatina, como a Sinvastatina, destacam-se por outros efeitos secundários, incluindo antiinflamatório (NICHOLLS et al., 2006), imunomodulatório, antioxidante, bem como a promoção da angiogênese e aumento da diferenciação dos osteoblastos, induzindo à formação óssea (MUNDY et al., 1999; CUNHA-CRUZ et al., 2006). Tais propriedades oferecem grande potencial para estatinas modificarem o curso de doenças inflamatórias crônicas (BARSANTE et al., 2005), dentre as quais podem ser incluídas as periodontites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura serão abordados tópicos referentes ao assunto em estudo.

2.1 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal (DP) é o resultado da destruição dos tecidos de suporte do elemento dental, resultante do acúmulo de biofilme dental. A sua evolução está ligada ao acúmulo do biofilme dental e à ação do sistema imunológico sobre os tecidos periodontais (KAMMA; SLOTS, 2003).

A principal causa da DP são os microrganismos periodontopatógenos, principalmente bactérias gram-negativas (PETERSEN; OGAWA, 2005) que compõem o biofilme dental. Essas bactérias liberam substâncias, como toxinas, enzimas e metabólitos que agredem diretamente os tecidos periodontais, e apresentam papel importante na iniciação do processo inflamatório presente na DP (LISTGARTEN, 1987).

A reação inflamatória associada a essa patologia pode danificar as estruturas conjuntivas, incluindo o osso alveolar, levando à perda dental (LINDHE; NYMAN, 1987). Múltiplas espécies microbianas contribuem para o início da progressão da DP, entretanto apenas uma minoria pode ser associada como agente etiológico da mesma; dentre elas, destacam-se *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* (TANNER et al., 1984; MACHTEI et al., 1999).

A primeira barreira de proteção que os microrganismos encontram nos tecidos periodontais são os neutrófilos. Eles são os responsáveis pela eliminação, através da fagocitose, dos microrganismos que conseguiram penetrar a barreira do epitélio juncional. No entanto, estes são capazes de produzir uma variedade de substâncias que, direta ou indiretamente, prejudicam os tecidos; dentre elas, há algumas proteases que digerem colágeno, elastina, tecidos epiteliais e conjuntivo, com destaque para a protease Arg-1, produzida pela *Porphyromonas gingivalis*, que degrada anticorpos e componentes do complemento (ADUSE-OPOKU et al., 1995). Outra protease, a leucotoxina, produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, tem um papel de

destruição dos leucócitos (GILLESPIE et al., 1993). Contudo, o efeito mais pode ser a própria resposta inata, inflamatória e imune do hospedeiro contra moléculas estranhas e antígenos presentes nas bactérias (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

2.2 PERIODONTITE EXPERIMENTAL

O estudo da doença periodontal em humanos tem suas limitações devido à grande variação que pode ocorrer de um indivíduo para outro ou até mesmo no próprio indivíduo, já que a gravidade dessa lesão pode variar de dente para dente, e, em um mesmo dente, de uma superfície para outra (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). Dessa forma, trabalhos têm utilizado animais para avaliar a patogênese e as modalidades terapêuticas possíveis em relação à DP (LISTGARTEN, 1975), tais como o modelo em primatas (HEIJL et al., 1976), cães (SCHROEDER; LINDHE, 1975) e roedores (JOHNSON, 1975; GALVÃO et al., 2003).

As principais vantagens da utilização do rato (*Rattus norvegicus*) como modelo para a DP experimental são custo reduzido para sua obtenção e fácil manuseio, podendo ser criados em condições *germ-free*, bem como podem ser utilizadas linhagens procriadas em condições de imunodeficiência (KLAUSEN, 1991). Além disso, nesse modelo de estudo os resultados são mais previsíveis no sentido de que a doença a ser estudada é reproduzida com um alto grau de confiabilidade (FRENKEL, 1969), pois existe muita semelhança com o homem em relação à anatomia periodontal, desenvolvimento e composição do biofilme bacteriano, histopatologia das lesões periodontais e imunologia básica.

Os ratos possuem um incisivo e três molares por hemiarcada. No entanto, os incisivos apresentam crescimento contínuo, sendo os molares os de escolha para utilização em periodontite experimental, por apresentarem estrutura e organização dos tecidos periodontais semelhantes aos humanos. A única diferença é o epitélio sulcular gengival, que apresenta-se queratinizado nesses animais (PAGE; SCHROEDER, 1982). Segundo Takata et al. (1988), os metabólitos do biofilme dento bacteriano colocados no sulco gengival penetram no tecido conjuntivo via epitélio juncional, descartando a importância da queratinização do epitélio sulcular nesses animais.

Os ratos apresentam a característica de erupção passiva dos dentes para compensar a atrição das superfícies oclusais com aumento da idade dos animais, além

de haver uma migração distal desses dentes e, com isso, uma contínua remodelação óssea alveolar. No entanto, a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar permanece constante em ratos livres de doença periodontal (KLAUSEN, 1991).

O método de indução de periodontite nesses animais pode ser por meio de manipulação dietética (SALLAY et al., 1984; KLAUSEN, 1991), da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (FIEHN; KLAUSEN; EVANS, 1992) e, ainda, a mais utilizada, que consiste na colocação de ligaduras de fio de algodão ou seda ao redor da região cervical dos molares, a nível da margem gengival e dentro do sulco gengival, permitindo o acúmulo de biofilme bacteriano, provocando conseqüentemente a inflamação gengival (JOHNSON, 1975; KARA et al., 2013).

O tempo de indução da doença tem variado. Johnson (1975) observou histologicamente um pico de reabsorção da crista óssea alveolar aos 17 dias após a colocação de ligaduras nos primeiros molares inferiores. Já Sallay et al. (1982) demonstraram que, com 9 dias, observava-se inflamação aguda, sequestro ósseo e destruição da crista óssea, sendo de origem bacteriana.

Em 2000, Bezerra et al. observaram que a perda óssea alveolar em modelo de periodontite experimental em ratos mostrava-se evidente após o 4º dia de indução da doença, alcançando pico máximo ao 7º dia, persistindo inalterado até o 11º dia. Samejima et al. (1990), demonstraram que a ligadura é um meio de implantação da *Eikenlla corrodens* na cavidade bucal dos ratos e que a mesma causa reabsorção óssea nesse modelo animal.

Com relação aos dentes que não recebem ligadura, estes apresentam um quadro de inflamação subclínica, o que é normal, pois não é possível eliminar todos os agentes irritantes da cavidade bucal (SAMEJIMA et al., 1990; GALVÃO et al., 2003).

Os aspectos clínicos e histológicos da periodontite experimental em ratos também são semelhantes aos humanos, onde se observa acúmulo de placa, achatamento e deslocamento da margem gengival, aumento da proliferação do epitélio para o tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório celular, principalmente de mononucleares, migração apical do epitélio juncional, reabsorção da crista óssea alveolar e região interradicular, reabsorção de cimento e dentina (KLAUSEN, 1991, BEZERRA et al., 2000).

Assim, estudos em ratos têm contribuído enormemente em várias áreas da periodontia, incluindo estrutura tecidual, regeneração, reações a drogas, bem como a

utilização em estudos de patogenicidade, estudos imunológicos e de imunização (PAGE; SCHROEDER, 1982; MATTIA et al., 1986; KLAUSEN, 1991).

2.3 DOENÇA PERIODONTAL E ESTRESSE OXIDATIVO

A descrição de espécies químicas na forma de radicais livres ocorreu no ano de 1900. Entretanto, reações envolvendo radicais livres no meio biológico foram consideradas de importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiam a detecção destes e os estudos da cinética das reações envolvendo espécies químicas de meia-vida curta (BERGENDI et al., 1999).

As espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN) são altamente reativas e com potencialidade deletéria ao organismo, mas quando produzidas em pequena quantidade, são toleradas e estão envolvidas em inúmeros processos de sinalização que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular. Assim, o equilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies reativas no organismo deve ser regulado, de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (CADENAS, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na existência de um desequilíbrio, as ERO/ERN promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Esses danos teciduais podem ser por meio da peroxidação lipídica, modificação de proteínas celulares e DNA, além de estimularem a liberação de citocinas inflamatórias (RIBEIRO, et al., 2005; NAKAJIMA et al., 2010).

Para evitar essa ação prejudicial das ERO/ERN, o corpo humano possui mecanismos de defesa antioxidantes que incluem a ação enzimática; entre as enzimas, cita-se a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (Se-Gpx); ou ação não-enzimática, pelas vitaminas A, C e E e pela glutatona reduzida (GSH). Através destas, o organismo mantém a concentração de ERO dentro dos limites fisiológicos e, através do sistema tioredoxina, regula o nível de alvos moleculares oxidados (RIBEIRO et al., 2005).

A GSH é um tripeptídeo, (γ Glu-Cys-Gli), formado por L-ácido glutâmico, L-cisteína e L-glicina, e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular. A manutenção de níveis adequados de GSH é feita às custas da atividade da glutatona

redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter glutatona na forma reduzida, como substrato para glutatona peroxidase. GSH é um antioxidante e participa de muitos processos biológicos, como na proteção contra radicais livres e compostos tóxicos (SIES, 1999).

O desequilíbrio entre ERO/ERN e antioxidantes é definido como estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode ser decorrente do aumento da produção das ERO/ERN, redução da defesa antioxidante ou de ambos (TAKAJIMA et al., 2010). Alguns autores demonstram que o estresse oxidativo está associado com a patogênese de uma série de condições patológicas, como câncer, artrite reumatoide, aterosclerose, doença de Parkinson, e, mais recentemente, tem sido investigado na periodontite (KARA et al., 2013).

Em um processo inflamatório e/ou infeccioso, como na periodontite, os leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos, são as primeiras células a serem ativadas na defesa do organismo junto com os macrófagos. Essas células apresentam a função de eliminar microrganismos invasores e, em seguida, morrem espontaneamente. São atraídas quimiotaxicamente por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e outros corpos estranhos para áreas de inflamação. Nesse sítio, os neutrófilos fagocitam os microrganismos, recobertos ou não com complemento ou anticorpos específicos, os quais são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por ERO/ERN (MARUYAMA et al., 2011; KARIM et al., 2012), tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (CANACKI; CICEK; CANACKI, 2005).

Na inflamação, a produção de ERO/ERN é um processo vital na defesa do organismo contra agentes estranhos a ele e se inicia quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento do microrganismo, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, as quais geram um aumento abrupto do consumo de oxigênio, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no neutrófilo um abrupto aumento da taxa metabólica, referido na literatura como *burst* oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica e geração de oxidantes derivados do oxigênio e do nitrogênio (BABIOR, 1984).

O *burst* respiratório é o evento central da fagocitose. Esse mecanismo microbicida oxidante dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, associado à sua membrana citoplasmática e à membrana dos grânulos específicos, chamado de

“nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido” (NADPH), hoje redenominado sistema Nox2 (ARNHOLD, 2004).

O *burst* respiratório não utiliza o O₂ para a síntese de ATP, através da respiração mitocondrial; este é transformado em metabólitos muito reativos, como ânions superóxido, peróxidos e outras espécies oxidantes que, por apresentarem grande reatividade com macromoléculas, são potencialmente capazes de desencadear efeitos lesivos (BABIOR, 1984; BRASILEIRO FILHO, 2004).

A evidência da ligação de estresse oxidativo com a destruição patológica do tecido conjuntivo durante a DP repousa sobre a presença e infiltração de neutrófilos como o evento principal na resposta do hospedeiro à invasão bacteriana. Dentre os oxidantes produzidos no fagossoma de neutrófilos, o ânion superóxido, nos tecidos periodontais, pode estar envolvido na sinalização de indução de reabsorção óssea (KATSURAGI et al., 2003); o radical hidroxila é extremamente reativo e capaz de danificar biomoléculas importantes, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, enquanto que o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar membranas, danificando células adjacentes e ampliando a cascata oxidativa. Com isso, a maioria dos artigos demonstram que a periodontite está associada ao aumento da peroxidação lipídica (TONGUC et al., 2011; PANJAMURTHY; MANOHARAN; RAMACHANDRAN, 2005) e de proteínas carboniladas (CANACKI et al., 2006; KONOPKA et al., 2007), além da diminuição dos antioxidantes, como GSH (TONGUC et al., 2011; KARA et al., 2013). Ainda existem evidências da diminuição de injúrias oxidativas e de alterações no sistema antioxidante após tratamento periodontal (KIM et al., 2010; KARA et al., 2013).

2.4 MÉTODOS COADJUVANTES NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE

O tratamento da doença periodontal baseia-se na eliminação da microbiota subgingival patogênica pela raspagem e alisamento radicular (RAR) (KALDAHL et al. 1993; LISTGARTEN, 1975). Entretanto, a terapia mecânica utilizada isoladamente pode ser falha na eliminação de bactérias patogênicas por localizarem-se no interior dos tecidos moles, duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como áreas de furca e depressões radiculares (ADRIAENS et al., 1988; BUDUNELI et al., 2007).

As estatinas são drogas inibidoras da enzima 3 – hidróxi – 3- metil – glutaril - coenzima A (HMG-CoA) redutase, conduzindo à gestão da produção do colesterol (JUNQUEIRA et al., 2002; KRONMANN et al., 2007). Dentre as várias estatinas, tem-se a Sinvastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, que tem sido amplamente utilizada na prática clínica, no controle dos níveis de colesterol. Com isso, além de sua função hipolipemiante, essa estatina destaca-se por outros efeitos secundários, incluindo anti-inflamatório (NICHOLLS et al., 2006), imunomodulatório, antioxidante, bem como a promoção da angiogênese e aumento da diferenciação dos osteoblastos, induzindo à formação óssea (MUNDY et al., 1999; CUNHA-CRUZ et al., 2006). Tais propriedades oferecem grande potencial para as estatinas modificarem o curso de doenças inflamatórias crônicas, dentre as quais podem ser incluídas as periodontites crônicas (BARSANTE et al., 2005).

Os efeitos secundários das estatinas estão intimamente relacionados ao seu grau de solubilidade. Estatinas lipofílicas apresentam maior potencial osteogênico (IZUMO et al., 2001), bem como exercem maior influência na via regulatória de monócitos que regulam a produção de citocinas, induzindo uma resposta inflamatória mais controlada tanto *in vivo* como *in vitro* (KIENER et al., 2001).

Mundy et al. (1999) relataram que, dentre as várias estatinas, a Sinvastatina e a Lovastatina estimulam a formação óssea quando injetadas subcutaneamente sobre a calvária de ratos, sendo esse efeito associado ao aumento da expressão de BMP-2 (proteína óssea morfogenética-2) em osteoblastos. Quando administradas por via oral, estas promoveram aumento do volume de osso esponjoso. Seguindo esse estudo, outros autores confirmam esse efeito positivo na formação óssea (OHNO et al., 2003). Esse efeito da estatina poderia ser interessante na regeneração de defeitos periodontais, especialmente a regeneração dos tecidos duros (YAZAWA et al., 2005).

Em estudos recentes, os efeitos estimulatórios das estatinas nas células osteoblásticas e tecido ósseo têm sido mostrados (CUNHA-CRUZ et al., 2006; HORIUCHI; MAEDA, 2006). As células do ligamento periodontal são relatadas por serem semelhantes às células de fibroblastos e também às células dos tecidos duros, tais como osteoblastos e cementoblastos (CUNHA-CRUZ et al., 2006; HORIUCHI; MAEDA, 2006).

Devido à importância da terapia regenerativa no tratamento periodontal, Yazawa et al. (2005) investigaram os efeitos da Sinvastatina nas células do ligamento periodontal, direcionando para a proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Demonstraram que as baixas concentrações de Sinvastatina promoveram efeitos positivos na proliferação celular e diferenciação osteoblástica de células humanas do ligamento periodontal; entretanto, quando administrada em alta concentração, apresentou efeito negativo. Portanto, há mecanismos biológicos plausíveis pelos quais os usos das estatinas poderiam provocar um impacto benéfico na doença periodontal (CUNHA-CRUZ et al., 2006).

Os lasers de baixa intensidade (LBI) também têm sido utilizados como métodos coadjuvantes no tratamento da doença periodontal. A palavra *laser* corresponde a uma sigla composta pelas primeiras letras de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, a qual significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação” (MALUF et al., 2006). É uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que em contato com os diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo do laser, em efeitos fotoquímicos, térmicos e não-lineares. A radiação laser não é invasiva, é muito bem tolerada pelos tecidos, não possui efeitos mutagênicos e pode ser usada repetidamente, sem riscos (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

Desde 1992, o uso dos lasers para o tratamento da doença periodontal tem sido relatado (MIDDA, 1992; COBB, 1996). Esses lasers foram concebidos com o objetivo de promover redução bacteriana e debridamento sulcular, a fim de desinfetar as bolsas periodontais (ANDREANA, 2005; CASTRO et al., 2006), devido às limitações relacionadas ao tratamento convencional de RAR.

Os LBI são usados com o propósito terapêutico, em virtude das baixas densidades de energia usada e comprimento de onda capaz de penetrar nos tecidos (CATÃO, 2004).

Os LBI mais utilizados em odontologia são os diodos de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs), semicondutores de emissão contínua ou pulsada. O bombeamento dos lasers semicondutores pode ser realizado de várias maneiras, como excitação produzida por uma corrente elétrica. Eles apresentam potências médias de algumas centenas de miliwatts; em sua maioria, apresentam emissão contínua ou, em alguns casos, emitem pulsos curtos e com comprimentos de onda na faixa do vermelho até infravermelho. Além disso, é sabido que esses comprimentos de onda atingem grande profundidade de penetração nos tecidos, pois a água e a hemoglobina oferecem um baixo coeficiente de absorção para esse tipo de radiação (RIBEIRO, 2000).

A radiação laser é apenas uma desencadeadora para a regulação do metabolismo celular, sendo necessárias baixas doses de energia por esse motivo. O efeito sobre a

célula vai depender do estado fisiológico em que esta se encontra. Os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis (KARU, 1989; RIBEIRO, 2000).

A terapia laser, quando utilizada nos tecidos e nas células, não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (CATÃO, 2004; ROCHA JUNIOR et al., 2007). Portanto, quando a luz laser interage com as células e tecido na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas, como estimulação de fotoreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno (POSTEN et al., 2005).

Os lasers estimulam fibroblastos, colaborando na produção de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização nas lesões (BASFORD, 1986).

Autores que estudaram a neoformação óssea sugerem que o efeito bioestimulante do laser não se deve apenas às suas propriedades específicas, mas também à criação de uma série de condições locais que poderiam acelerar a neoformação óssea e a resolução de edemas (MALUF et al., 2006).

Lizarelli et al. (1999) avaliaram histologicamente o efeito da irradiação com laser de baixa intensidade, cujo meio ativo era o AsGaAl (790nm, 1,5J/cm², 20s, 0,03W), na cronologia do reparo alveolar de ratos. Os resultados encontrados mostraram que a terapia com LBI promove 10% de aceleração na formação óssea, na quantidade de osteoide em alguns períodos do processo regenerativo.

Brugnera Júnior e Pinheiro (1998) indicam o uso do LBI no alívio da dor (pelo fato de aumentar a concentração de betaendorfina no líquido cefalorraquidiano), na reparação tecidual (pois ativa o estímulo da proliferação de fibroblastos, com produção de fibras elásticas e colágenas e aumenta a celularidade dos tecidos irradiados, acelerando o tempo de mitose) e no controle da inflamação (devido à aceleração da microcirculação, originando as alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários).

Estudos têm sugerido a terapia laser como uma forma de tratamento não cirúrgico para a periodontite ou, ainda, como um método coadjuvante aos procedimentos convencionais de RAR, pois através dele é possível eliminar o cálculo, criar uma superfície radicular biocompatível (AOKI et al., 2004), além de ajudar a

reduzir a inflamação nas bolsas periodontais, favorecendo a cicatrização das mesmas (MORITZ et al., 1998).

Um estudo realizado por Garcia et al. (2010) comparou os efeitos do LBI na periodontite induzida em ratos modificados com dexametasona. Os resultados mostraram que o LBI utilizado com coadjuvante à RAR proporcionou uma menor perda óssea. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado não existirem diferenças entre o tratamento convencional e a utilização associada do LBI (MIYAZAKI et al., 2003; LIN et al., 2011). Essas evidências conflitantes podem ser devido às diferenças metodológicas na utilização do laser e dos diferentes parâmetros de irradiação utilizados.

Segundo De Micheli et al. (2005), em Periodontia o uso da LBI tem sido vastamente estudado com as seguintes finalidades: acelerar a reparação tecidual e promover redução e/ou morte bacteriana, quando associada ao emprego de corantes fotossensibilizadores (terapia fotodinâmica).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da laserterapia e da Sinvastatina no tratamento da periodontite experimental em ratos, por meio da análise dos marcadores de estresse oxidativo e da mensuração a distância entre a união cimento-esmalte e crista óssea alveolar, na região mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, seguindo as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob protocolo 472/2012 (ANEXO A).

4.1 ANIMAIS

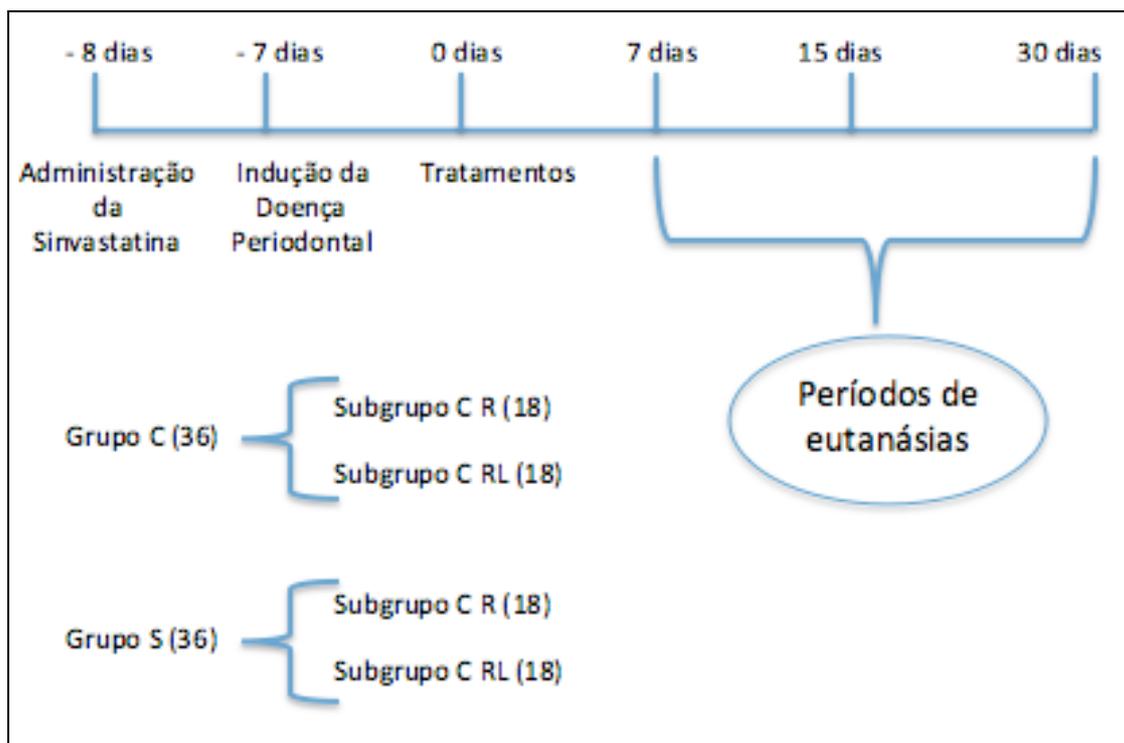
No estudo, foram utilizados 78 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente de 200 a 250 g, com 2 a 3 meses de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG. Esses animais foram mantidos em gaiolas plásticas com cinco animais cada uma, sendo alimentados com ração e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Controle (C) e Sinvastatina (S), com trinta e seis animais cada um. Seis animais foram mantidos como controle basal, ou seja, nenhum tratamento local ou sistêmico foi realizado.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais do Grupo C (n=36) receberam por via oral 0,5 mg/kg de peso corpóreo de polietilenoglicol 400 (veículo), e os do grupo S (n=36), 0,5 mg/kg de peso corpóreo de Sinvastatina (MORRIS et al., 2008). As administrações foram realizadas diariamente e em dose única, iniciadas 24 h antes da indução da DP (DALCICO et al., 2013) e mantidas até o final dos respectivos períodos de eutanásias (FIGURA 1).

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental para manutenção das doses. O preparo da Sinvastatina, obtida em farmácia de manipulação, foi realizado pela diluição em polietilenoglicol, obtendo-se concentração final de 1 mg/mL.

FIGURA 1 – Delineamento do estudo



Fonte: Da autora.

4.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Após 24 h do início da administração oral, a DP foi experimentalmente induzida. Realizou-se a anestesia dos animais através de injeção intramuscular, associando-se 70 mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – EUA) e 6 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil). Com o auxílio de uma pinça modificada, adaptou-se um fio de algodão número 10 (Corrente Algodão n° 10; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, mantidos em posição por meio de nós cirúrgicos (JOHNSON, 1975) (FIGURAS 2 a 5).

FIGURA 2 - Animal posicionado na mesa operatória



Fonte: Da autora.

FIGURA 4 - Posicionamento do fio



Fonte: Da autora.

FIGURA 3 - Pinça modificada utilizada para passagem do fio



Fonte: Da autora.

FIGURA 5 - Fio Posicionado



Fonte: Da autora.

4.4 TRATAMENTO LOCAL

Decorridos 7 dias da indução e evolução da DP, a ligadura foi removida dos animais dos Grupos C e S (FIGURA 6). A seguir, os animais foram divididos em subgrupos de acordo com os tratamentos: raspagem, alisamento radicular e irrigação com 1 mL de soro fisiológico (RAR); raspagem, alisamento radicular e irrigação com 1 mL de soro fisiológico e irradiação com laser em baixa intensidade (RAR/LBI), no primeiro molar inferior esquerdo (FIGURA 7).

Os procedimentos de RAR foram realizados utilizando-se Cureta de Gracey Mini - five 5 e 6 (Hu-Friedy MFG. Corporation. Inc. Chicago, USA) com três movimentos no sentido mesio-distal tanto na face vestibular quanto na face lingual. As soluções de soro fisiológico foram depositadas lentamente no interior da bolsa periodontal, utilizando-se seringa (1 mL) e agulha para insulina (13 mm x 0,04 mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sem bisel.

O laser de baixa intensidade utilizado neste estudo foi o de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) (Bio Laser Onda LBI; Kondortech Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e potência de 30 mW. A irradiação laser foi realizada no modo contínuo, em contato com a área e de forma pontual. A luz laser foi direcionada ao interior da bolsa periodontal em 3 pontos equidistantes na superfície vestibular e 3 pontos equidistantes na superfície lingual. Cada ponto foi irradiado por 3 segundos, recebendo uma dose pontual de $1,273 \text{ J/cm}^2$, totalizando 18 segundos de tempo de exposição e dose total de $7,639 \text{ J/cm}^2$ (FIGURA 8).

FIGURA 6 - Doença periodontal após 7 dias de indução



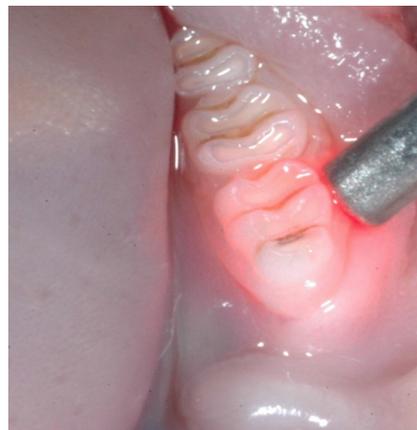
Fonte: Da autora.

FIGURA 7 - Raspagem e alisamento radicular



Fonte: Da autora.

FIGURA 8 – Aplicação do laser em baixa intensidade



Fonte: Da autora.

4.5 PERÍODOS EXPERIMENTAIS

Seis animais de cada subgrupo experimental foram eutanasiados por exanguinação aos 7, 15 e 30 dias pós-tratamentos locais, para posterior análise dos

marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. As mandíbulas foram removidas para coleta do tecido gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos, do lado vestibular, para análise bioquímica. Além disso, foi coletado, no primeiro molar inferior esquerdo por vestibular, tecido gengival de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento tanto local quanto sistêmico com o objetivo de se obter os valores basais desses marcadores. A seguir, as mandíbulas foram seccionadas ao meio e fixadas em formol tamponado a 10% por um período de no mínimo 48 horas, para posterior análise radiográfica.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS GENGIVAIS

Amostras de tecido gengival foram homogeneizadas com tampão fosfato (3 mL, pH 6,5). O homogenato foi centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado em alíquotas para posterior análise bioquímica.

4.6.1 Determinação da concentração proteica total

As concentrações proteicas foram determinadas em todas as amostras de homogeneizados gengivais pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão da curva de calibração.

4.6.2 Determinação do tripeptídeo glutationa (GSH)

Para a verificação de GSH no tecido gengival de ratos, os derivados alquilados do mBBr dos tecidos foram separados por CLAE (em coluna C-18 (Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5µm, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm), equilibrada com tampão A (etanol 14,2% e ácido acético 0,25% m/v, 1 mL/minuto). Amostras das suspensões teciduais, derivatizadas com mBBr, foram injetadas, e a diluição (tampão A) foi realizada durante 30 minutos. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão B (metanol 90% e ácido acético 0,25%) por 8 minutos e reequilibrada com o tampão A. A determinação de ácido sulfossalicílico

(padrão interno de referência), cisteína e glutathiona reduzida foi realizada pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos (10-200 nmol) através de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL), utilizando-se $\lambda_{exc}=394\text{nm}$ e $\lambda_{emi}=490\text{nm}$ ($\epsilon=20\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), e a quantificação foi feita por análise da integral das respectivas áreas (Software "LC-Solution Multi") (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Para padronização do método foi feita uma curva de calibração usando padrões de GSH. Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente que tem mBBr como agente derivatizante.

4.6.3 Determinação de malondialdeído (MDA)

Para cada 50 μL de homogeneizados gengivais em tampão fosfato pH 7,2, adicionou-se 250 μL de ácido fosfórico 1,22 M, 450 μL de Água Mili-Q e 250 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) reagente. Após esse procedimento, agitou-se as alíquotas por 30 segundos, incubou-se a reação por 1 h em banho-maria a 95°C e resfriou-se em banho de gelo a 4°C. Depois disso, adicionou-se 360 μL de metanol (grau CLAE) e 40 μL de NaOH 1M para 200 μL de amostra, para neutralizar os solutos e precipitar as proteínas antes de injetar na coluna de CLAE, através de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se $\lambda_{exc}=515\text{nm}$ e $\lambda_{emi}=553\text{nm}$. (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Para padronização do método foi feita uma curva de calibração usando padrões de MDA. Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente que tem TBA como agente derivatizante.

4.6.4 Determinação de proteínas carboniladas (CPO)

Para a determinação dessas proteínas carboniladas pode-se utilizar 500 μL das alíquotas em tampão fosfato pH 7,2, acrescentando-se 500 μL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 μM . Depois, incubar por 1 h e seguir gotejando 500 μL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 20%, até a precipitação completa. Acrescentar 500 μL da solução Etanol/Acetato de Etila e centrifugar a 2000 rpm, por 10 minutos.

Descartar o sobrenadante, adicionar novamente 500 µL da solução Etanol/Acetato de Etila e centrifugar. A seguir, descartar o sobrenadante e dissolver o precipitado com 1000 µL de Guanidina 6 M, que deverá ser homogeneizada. A taxa de variação em absorvância foi medida espectrofotometricamente a 370 nm (PUNCHARD; KELLY, 1996).

4.7 TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL

Após a fixação das peças em solução de formol a 10% por 48 horas, os lados direito e esquerdo da mandíbula foram divididos e radiografados.

Sobre uma mesa, a hemimandíbula esquerda foi posicionada com a superfície vestibular voltada para a película radiográfica (Dental Intraoral E-Speed Film - Kodak).

A padronização das tomadas radiográficas foi obtida da seguinte forma:

- a) uso de um aparelho de raios X Pampas - E (General Eletric, Milwaukee, EUA), com regime elétrico de 65 kvp, 10 mA;
- b) feixe central de raio X incidindo perpendicularmente ao plano do filme-objeto, em um ângulo de 90° com a superfície da placa óptica;
- c) distância focal de 30 cm;
- d) tempo de exposição de 0,8 segundos;

As radiografias foram reveladas utilizando-se soluções de revelador e fixador Kodak, pelo método de revelação clima – tempo.

As radiografias foram escaneadas e as imagens foram analisadas no programa Imagelab (Softium, Brasil), com o uso da ferramenta distância e ângulo de mensuração. Um examinador cego aos tratamentos realizados e calibrado mediu a distância da união cimento-esmalte à crista óssea alveolar na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos pelo traçado de uma linha, sendo essas medidas registradas em milímetros (mm). Mediu-se três vezes cada dente e os valores foram as médias aritméticas destas três medidas. O mouse era posicionado na região correspondente à união cimento-esmalte. O botão esquerdo era acionado e arrastado até ao nível da crista óssea alveolar e o programa mensurava a distância automaticamente.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

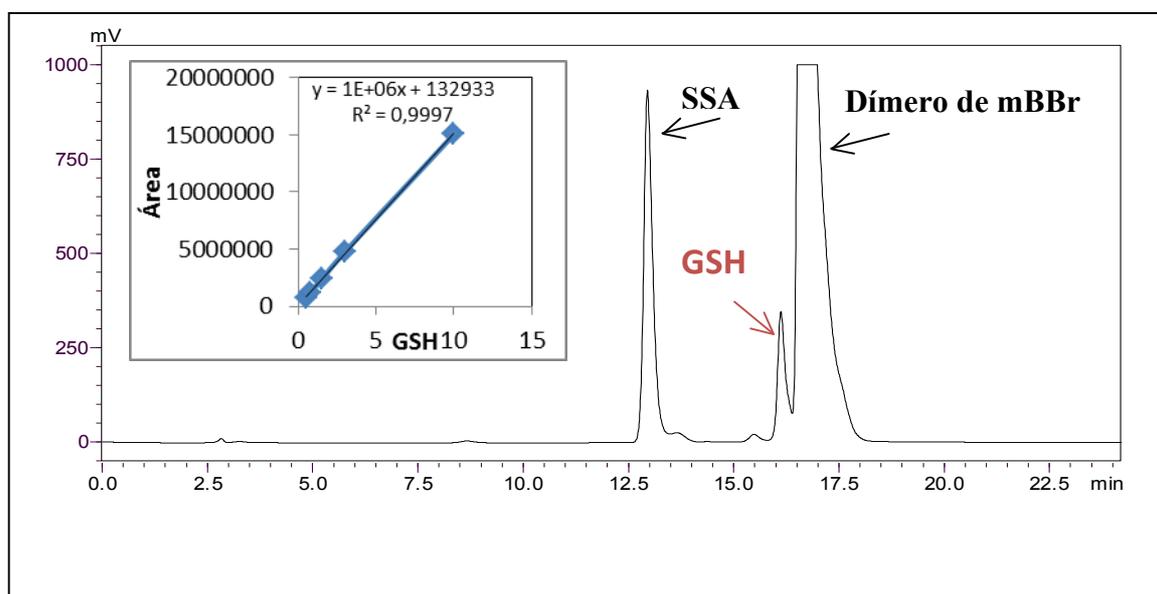
A análise estatística dos dados radiográficos e bioquímicos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil). A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa na taxa de perda óssea na região mesial dos primeiros molares entre os diferentes grupos/subgrupos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada. Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, a análise intra e intergrupos/subgrupos foi realizada por meio de dois critérios ANOVA com complementação de Bonferroni com $p < 0,01$, no radiográfico, e complementação por Tukey com $p < 0,05$, no bioquímico.

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM DE GSH EM AMOSTRAS GENGIVAIS

Os cromatogramas, representando a corrida cromatográfica com o padrão de GSH e outro com a amostra, podem ser vistos a seguir:

FIGURA 9 – Cromatograma característico de detecção de GSH, no padrão, após derivatização com mBBr

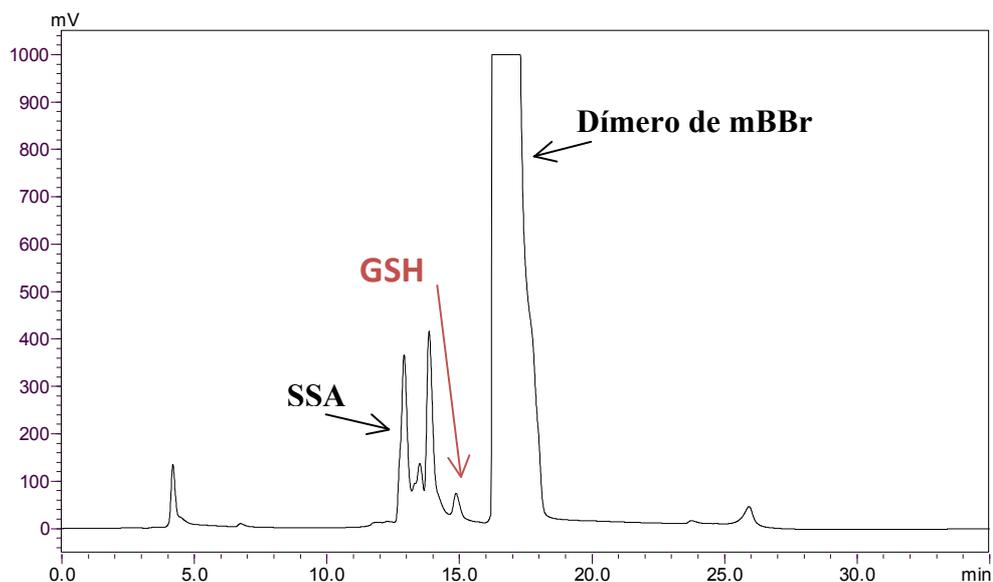


Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi de 15,5 minutos.

Inserido curva de calibração de GSH.

Fonte: Da autora.

FIGURA 10 – Cromatograma característico de detecção de GSH, na amostra, após derivatização com mBBr



Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi de 15,5 minutos.

Fonte: Da autora.

Os níveis de GSH sofreram um decréscimo significativo ($p < 0,05$) aos 7 e 15 dias, tanto no grupo C como no da S, em relação ao Basal.

Na comparação intra-grupo, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de GSH, entre os períodos de 7, 15 e 30 dias, em ambos os grupos estudados. Já na comparação entre os tratamentos, o tratamento RAR teve uma diminuição maior ($p < 0,05$) de GSH do que no tratamento RAR/LIB, aos 7 e 30 dias, tanto no grupo C como no grupo S.

Na análise intergrupos, observa-se que os valores de GSH no grupo C foi menor do que no grupo S ($p < 0,05$), tanto no tratamento de RAR como no de RAR/LIB, e em todos os períodos experimentais (TABELA 1).

TABELA 1- Efeito da administração oral de sinvastatina sobre o conteúdo de glutathione reduzida em amostras gengivais. Periodontite foi induzida por ligadura e GSH foi doseada através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=394nm$; $\lambda_{emi}=490nm$) após reação com monobromobimano

Grupo		Controle		
Basal		59,30±8,10 ⁻		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		8,88±3,13 ^{-+*}	15,30±3,30 ⁻⁺	41,90±4,30 ^{-+*}
RAR/LIB		11,30±1,17 ^{-+*}	16,21±4,13 ⁻⁺	53,45±5,08 ^{+*}
Grupo		Sinvastatina		
Basal		59,30±8,10 ⁻		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		17,22±2,02 ^{-+*}	26,78±9,02 ⁻⁺	55,47±2,02 ^{+*}
RAR/LIB		23,05±2,14 ^{-+*}	24,72±1,79 ⁻⁺	64,85±5,17 ^{+*}

Nota: Os resultados estão expressos como média±d.p; n=6. RAR=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico; RAR/LIB=RAR/laser em baixa intensidade.

⁻ Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

⁺ Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

^{*} Diferença entre os tratamentos, mesmo grupo e período (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

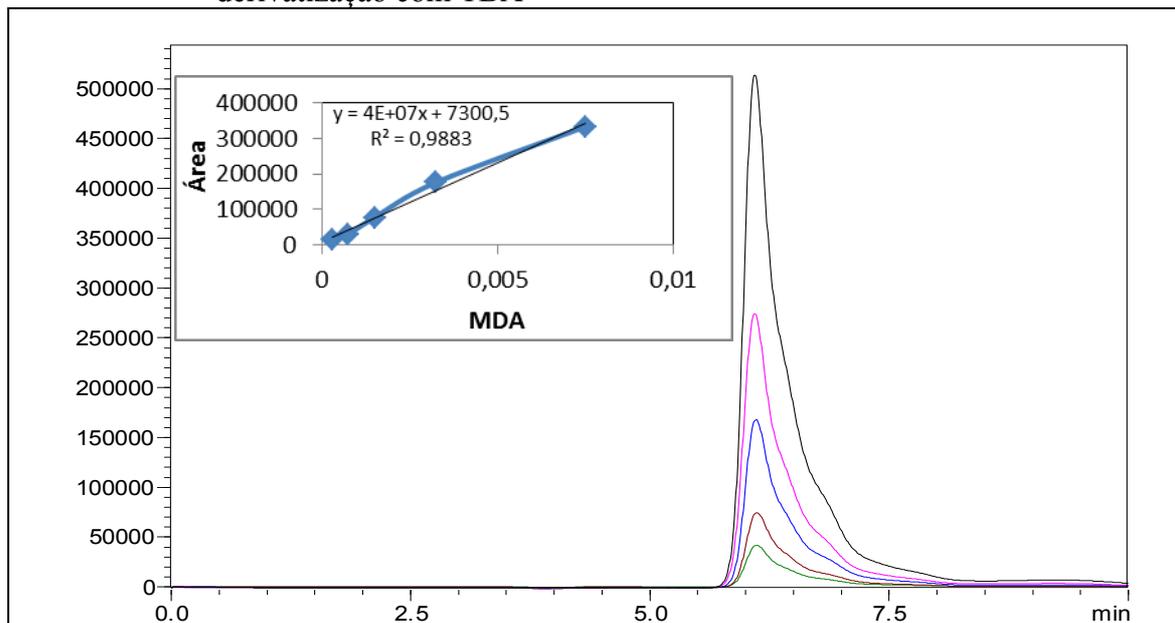
[·] Diferença entre os grupos, mesmo tratamento e período (ANOVA e Tukey, com p<0,05).

Fonte: Da autora.

5.2 TEOR DE MDA EM TECIDOS GENGIVAIS

As corridas cromatográficas de padrão e amostra, podem ser vistos a seguir:

FIGURA 11 – Cromatograma característico de detecção de MDA, no padrão, após derivatização com TBA

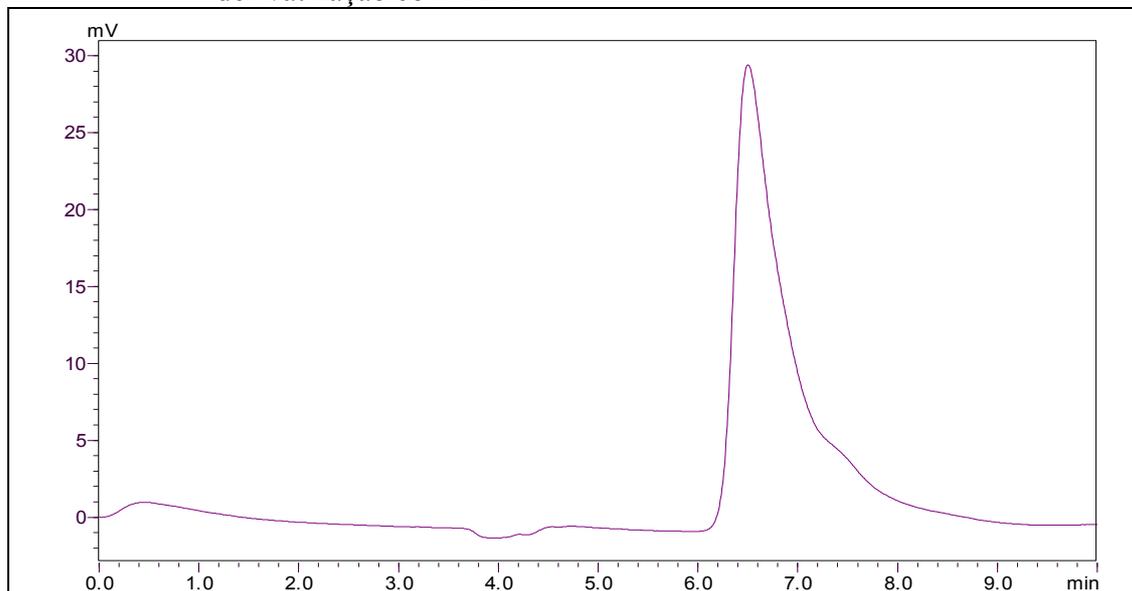


Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi 6,5 minutos.

Inserido curva de calibração de MDA.

Fonte: Da autora.

FIGURA 12 – Cromatograma característico de detecção de MDA, na amostra, após derivatização com TBA



Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi 6,5 minutos.

Fonte: Da autora.

O nível de MDA que observou aumento significativo ($p < 0,05$) foi aos 7 dias, do grupo S, no tratamento de RAR/LIB, com relação ao grupo basal.

Nas demais comparações, intra e intergrupos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (TABELA 2).

TABELA 2- Efeito da Sinvastatina sobre lipoperoxidação decorrente de periodontite induzida. A ocorrência de danos oxidativos em lipídeos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=515nm$; $\lambda_{emi}=553nm$) para detecção do aduto MDA-ácido tiobarbitúrico

Grupo		Controle		
Basal		0,33±0,02 [†]		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		0,29±0,17	0,39±0,07	0,61±0,07
RAR/LIB		0,47±0,12	0,48±0,12	0,35±0,09
Grupo		Sinvastatina		
Basal		0,33±0,02 [†]		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		0,51±0,11	0,37±0,06	0,60±0,15
RAR/LIB		0,75±0,09 [‡]	0,43±0,11	0,40±0,28

Nota: Os resultados estão expressos como média±d.p; n=6. RAR=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico; RAR/LIB=RAR/laser em baixa intensidade.

- Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

[†]Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

*Diferença entre os tratamentos, mesmo grupo e período (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

·Diferença entre os grupos, mesmo tratamento e período (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

Fonte: Da autora.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CPO

Os níveis de CPO tiveram um aumento significativo ($p<0,05$) com relação ao basal, no tratamento de RAR, grupo C. Já no grupo S, essa diferença significativa ($p<0,05$) foi observada tanto no tratamento RAR como no RAR/LIB, mas apenas aos 7 dias.

Na comparação intra-grupo, verificou-se diferença significativa ($p<0,05$) nos valores de CPO, entre os períodos de 7, 15 e 30 dias, em ambos os grupos estudados. Já na comparação entre os tratamentos, o tratamento RAR teve um aumento maior

($p<0,05$) das taxas de CPO do que o tratamento RAR/LIB, em todos os períodos experimentais nos grupos C e S.

Na análise intergrupos, observou-se que os valores de CPO no grupo C foi maior do que no grupo S ($p<0,05$); no tratamento RAR, aos 7, 15 e 30 dias. Já no tratamento RAR/LIB ocorreu o inverso, ou seja, os níveis de CPO foram menores significativamente ($p<0,05$) no grupo C em comparação ao S, aos 7 e 15 dias, enquanto, aos 30 dias, o grupo S apresentou novamente os menores níveis de CPO ($p<0,05$) (TABELA 3).

TABELA 3- Efeito da sinvastatina em danos oxidativos em proteínas induzidos por periodontite experimental. O conteúdo de carbonilas proteicas foi determinado em amostras gengivais através de análise espectrofotométrica ($\lambda=370$ nm; $\epsilon=22.000$ M⁻¹.cm⁻¹)

Grupo		Controle		
Basal		6,43±1,22 ⁻		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		71,0±4,3 ^{-+*}	23,1±11,3 ^{-+*}	38,7±4,3 ^{-+*}
RAR/LIB		4,63±1,11 ^{+*}	1,95±0,11 ^{+*}	2,32±0,19 ^{+*}
Grupo		Sinvastatina		
Basal		6,43±1,22 ⁻		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamentos				
RAR		12,6±2,14 ^{+*}	4,77±1,14 ^{+*}	3,99±1,04 ^{+*}
RAR/LIB		15,5±1,98 ^{-+*}	3,38±1,08 ^{+*}	1,01±0,01 ^{+*}

Nota: Os resultados estão expressos como média±d.p; n=6. RAR=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico; RAR/LIB=RAR/laser em baixa intensidade.

- Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

⁺Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

*Diferença entre os tratamentos, mesmo grupo e período (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

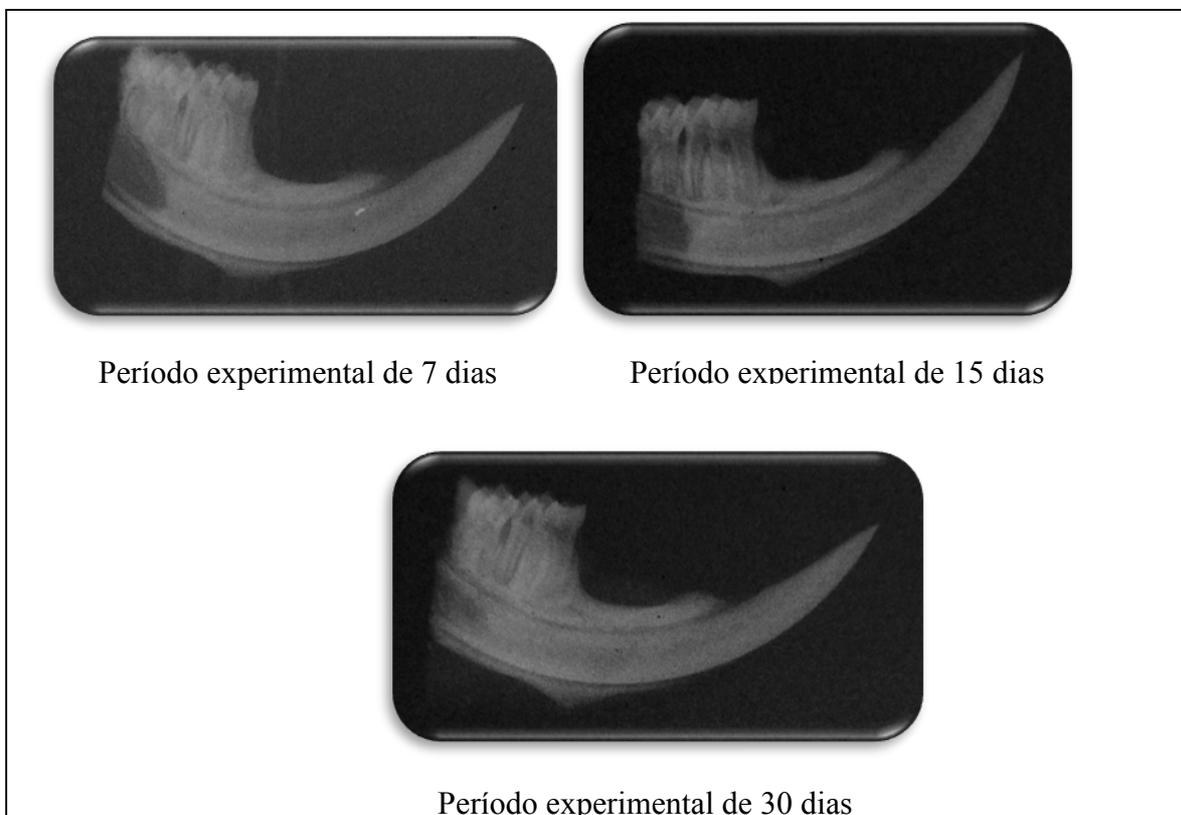
⁻Diferença entre os grupos, mesmo tratamento e período (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

Fonte: Da autora.

5.4 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

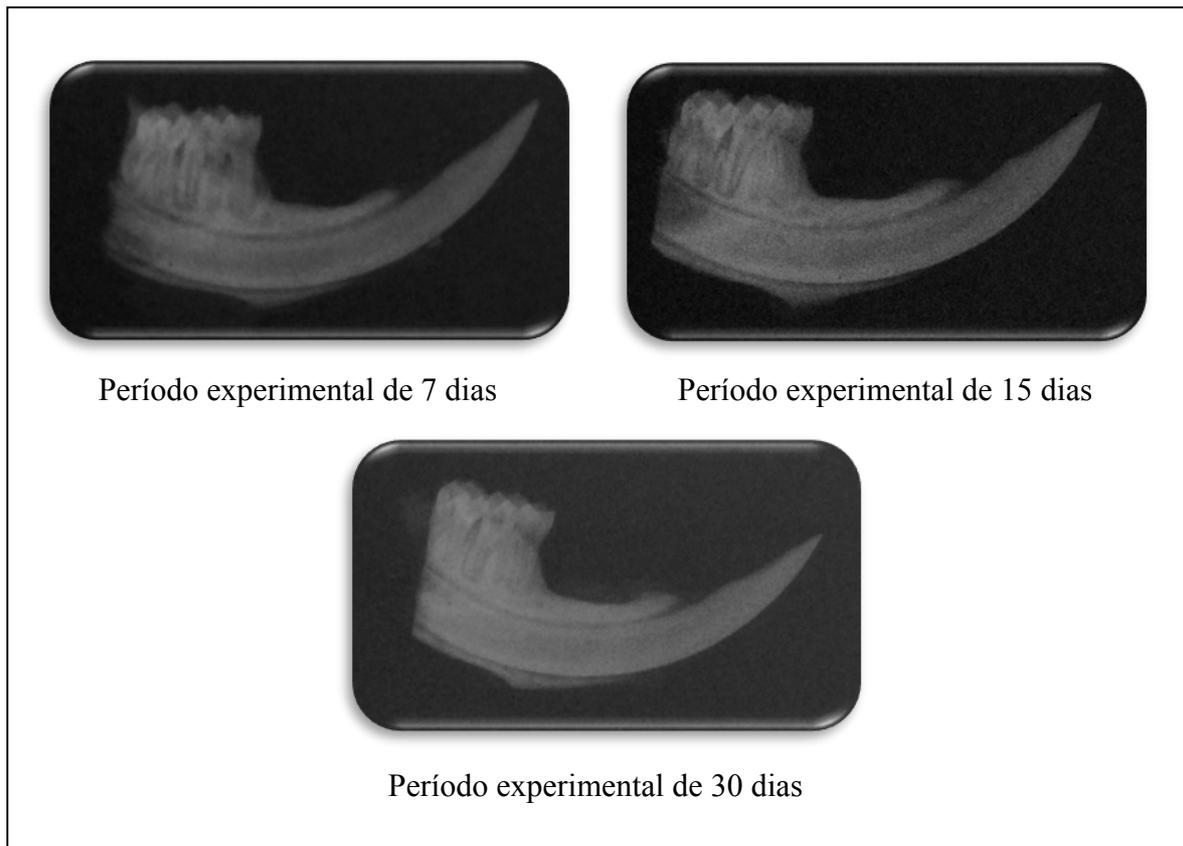
Os animais do grupo C apresentaram uma PO significativamente maior ($p < 0,01$) no tratamento RAR ($1,99 \pm 0,37\text{mm}$; $1,76 \pm 0,21\text{mm}$; $1,44 \pm 0,22\text{ mm}$) comparado ao RAR/LIB, aos 7, 15 e 30 dias ($0,62 \pm 0,15\text{mm}$; $0,59 \pm 0,12\text{mm}$; $0,53 \pm 0,16\text{mm}$). Ainda pode-se observar uma menor PO ($p < 0,01$) aos 30 dias no RAR comparado com o período de 7 dias ($1,44 \pm 0,22\text{mm}$; $1,99 \pm 0,37\text{mm}$) (FIGURAS 13 e 14; TABELA 4).

FIGURA 13 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C que receberam o tratamento RAR. Período de 7, 15 e 30 dias respectivamente



Fonte: Da autora.

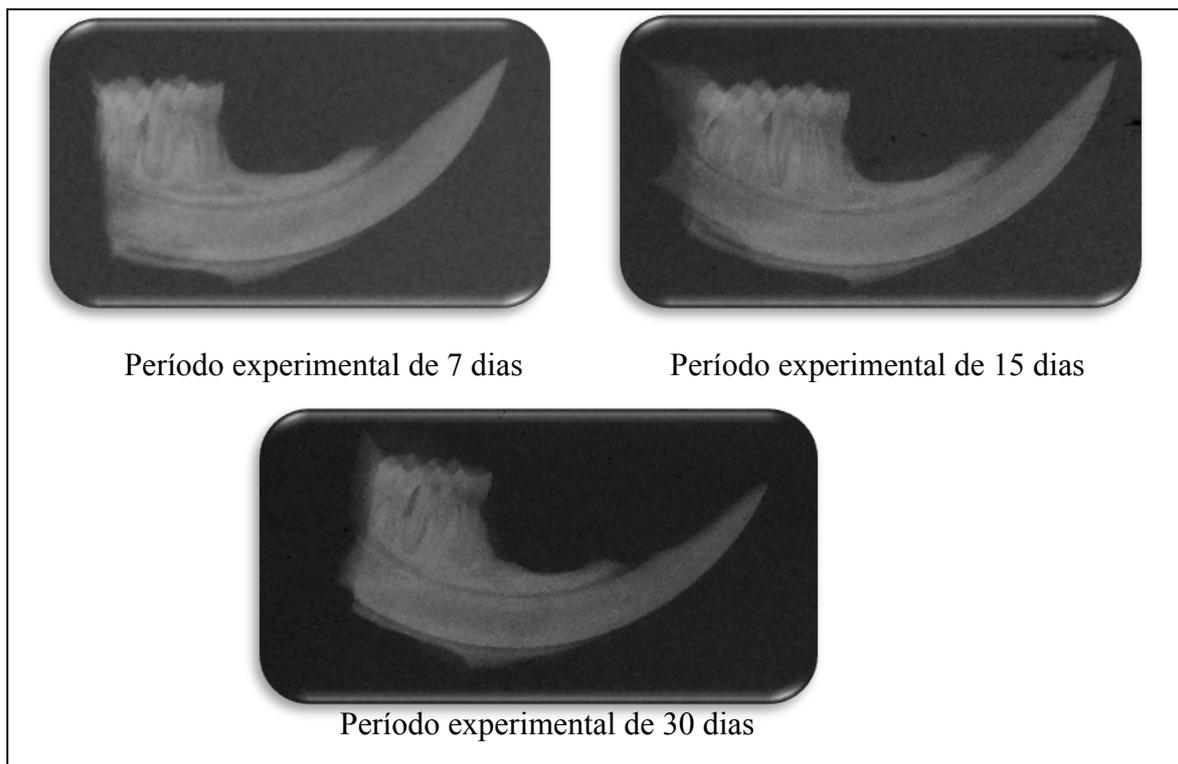
FIGURA 14 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C que receberam o tratamento RAR/LIB. Período de 7, 15 e 30 dias respectivamente



Fonte: Da autora.

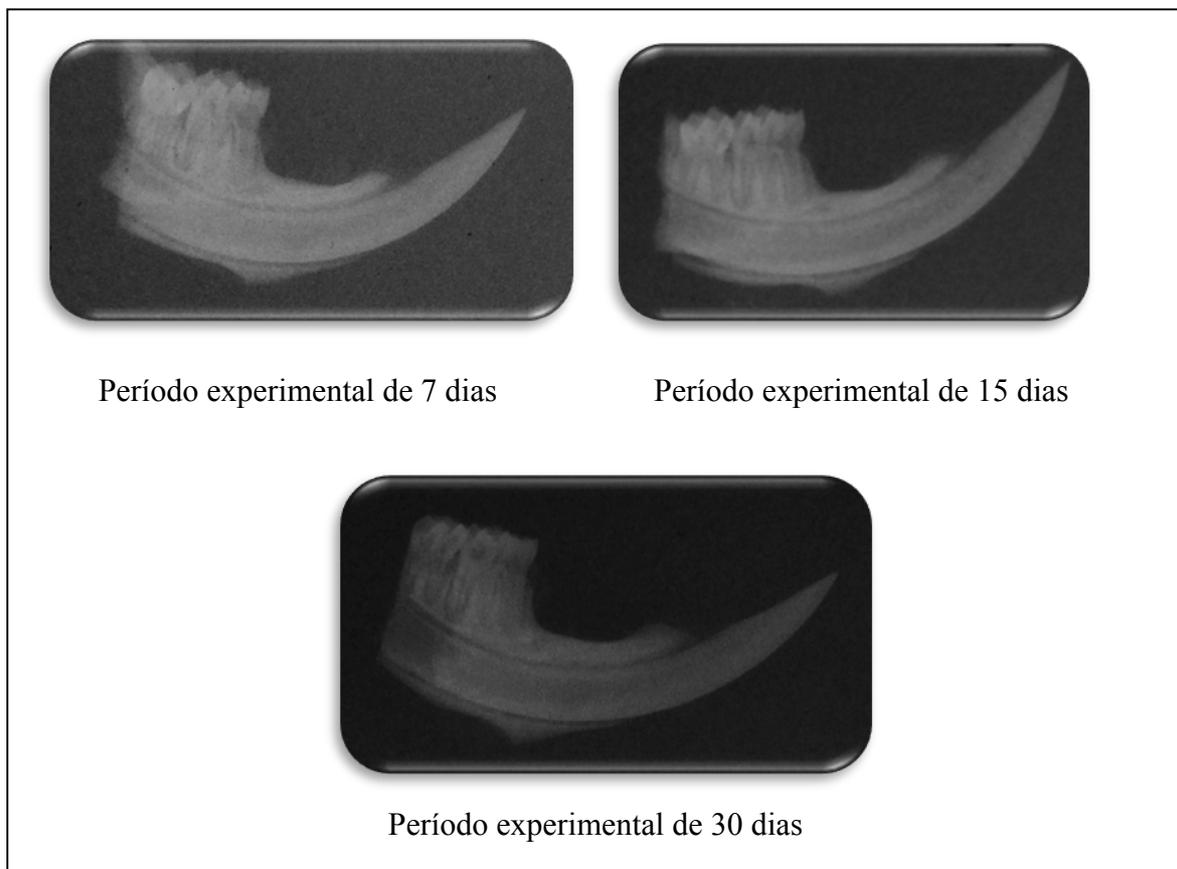
Já nos animais do grupo S, ocorreu uma PO significativamente maior ($p < 0,01$) no tratamento RAR ($1,55 \pm 0,32\text{mm}$; $1,45 \pm 0,19\text{mm}$; $1,35 \pm 0,38\text{mm}$) comparado ao RAR/LIB ($0,52 \pm 0,21\text{mm}$; $0,51 \pm 0,24\text{mm}$; $0,48 \pm 0,31\text{mm}$), em todos os períodos experimentais (FIGURAS 15 e 16 e TABELA 4).

FIGURA 15 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo S que receberam o tratamento RAR. Período de 7, 15 e 30 dias respectivamente



Fonte: Da autora.

FIGURA 16 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo S que receberam o tratamento RAR/LIB, Período de 7, 15 e 30 dias respectivamente



Fonte: Da autora.

Na análise entre os grupos, o tratamento RAR apresentou uma PO significativamente maior ($p < 0,01$) nos animais do grupo C ($1,99 \pm 0,37$ mm) comparado aos animais do grupo S ($1,55 \pm 0,32$ mm), no período de 7 dias. No grupo C, o tratamento RAR ($1,99 \pm 0,37$ mm; $1,76 \pm 0,21$ mm; $1,44 \pm 0,22$ mm), em todos os períodos, apresentou uma maior PO ($p < 0,01$), comparado aos animais do grupo S tratados por RAR/LIB ($0,52 \pm 0,21$ mm; $0,51 \pm 0,24$ mm; $0,48 \pm 0,31$ mm). Além disso, observou-se uma menor PO no grupo C tratado por RAR/LIB ($0,62 \pm 0,15$ mm; $0,59 \pm 0,12$ mm; $0,53 \pm 0,16$ mm) em relação ao tratamento RAR no grupo S ($1,55 \pm 0,32$ mm; $1,45 \pm 0,19$ mm; $1,35 \pm 0,38$ mm), aos 7, 15 e 30 dias (TABELA 4).

TABELA 4- Médias e desvios padrões (M±DP) das distâncias entre a união cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período.

Grupo		Controle		
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamentos				
RAR	1,99±0,37 ^{†*}	1,76±0,21 [*]	1,44±0,22 ^{†*}	
RAR/LIB	0,62±0,15 [*]	0,59±0,12 [*]	0,53±0,16 [*]	

Grupo		Sinvastatina		
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamentos				
RAR	1,55±0,32 ^{†*}	1,45±0,19 [*]	1,35±0,38 [*]	
RAR/LIB	0,52±0,21 [*]	0,51±0,24 [*]	0,48±0,31 [*]	

Nota: RAR= Raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico. RAR/LIB= RAR e Laser em Baixa Intensidade; n=6.

[†]Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Bonferroni, com p<0,01).

^{*}Diferença entre os tratamentos, mesmo grupo e período (ANOVA e Bonferroni, com p<0,01).

·Diferença entre os grupos, mesmo tratamento e período (ANOVA e Bonferroni, com p<0,01).

·Diferença entre os grupos e tratamentos, mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com p<0,01).

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

A DP é um processo inflamatório crônico caracterizado por sangramento gengival, formação de bolsas periodontais e destruição dos tecidos periodontais de sustentação, através da liberação de lipopolissacarídeos e proteases (YAGAN et al., 2013) das bactérias presentes no biofilme dental, fator etiológico determinante dessa alteração. Essa inflamação tecidual é relacionada com o aumento da liberação de ROS pelos neutrófilos, e também com a ativação de vários mediadores inflamatórios, tais como interleucinas (IL-1 β , 6 e 8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (KARA et al., 2013), o que favorece o desequilíbrio da homeostase óssea, resultando na destruição de tecido ósseo alveolar, aumento da atividade de metaloproteínases de matriz e degradação dos tecidos conjuntivos (CHAPPLE; MATTHEWS, 2007), devido à reação imunológica exacerbada e osteoclastogênese localizada (KUHR et al., 2004).

O tratamento periodontal é direcionado para deter a progressão de destruição dos tecidos de sustentação dos dentes, a fim de evitar a perda dentária. Entretanto, existem ocorrências em que a terapia periodontal mecânica é eficaz, o que aponta para a hipótese de que fatores sistêmicos ainda pouco explorados possam interferir na progressão da doença. Assim, uma possível suplementação com antioxidantes pode ser uma terapia coadjuvante eficiente.

Estatinas são drogas inibidoras da enzima 3 – hidróxi – 3- metil – glutaril - coenzima A (HMG-CoA) redutase, conduzindo à gestão da produção do colesterol (JUNQUEIRA et al., 2002; KRONMANN et al., 2007). Dentre as várias estatinas, tem-se a Sinvastatina, que tem sido amplamente utilizada na prática clínica, no controle dos níveis de colesterol, apresentando segurança farmacológica comprovada. Com isso, além de sua função hipolipidêmica, essa estatina destaca-se por outros efeitos secundários, incluindo o anti-inflamatório (NICHOLLS et al., 2006), o imunomodulatório, o antioxidante, bem como a promoção da angiogênese e aumento da diferenciação dos osteoblastos, induzindo à formação óssea (MUNDY et al., 1999; CUNHA-CRUZ et al., 2006). Tais propriedades oferecem grande potencial para a estatina modificar o curso de doenças inflamatórias crônicas (BARSANTE et al., 2005), dentre as quais podem ser incluídas as periodontites crônicas.

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não possuem correspondentes em outras espécies, a DP inflamatória é comum no reino animal.

Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à doença periodontal inflamatória. O rato (*Rattus norvegicus*) é o animal mais utilizado nesses estudos (LISTAGARTEN, 1975), devido à semelhança do seu periodonto com o do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular (KLAUSEN, 1991).

O presente estudo apoiou-se no modelo de indução da DP proposto por Johnson (1975), através da colocação de um fio de algodão ao redor da cervical dos molares, geralmente o primeiro molar superior ou inferior. Segundo o modelo proposto por Johnson, a ligadura funciona como sítio para a colonização bacteriana, desenvolvendo dessa forma a doença periodontal, sendo esse um método amplamente utilizado (ALMEIDA et al., 2007; AKMAN et al., 2013; YAGAN et al., 2013). Observamos, no presente estudo, que esse modelo foi eficiente na indução da DP experimental, pois a ligadura induziu à formação de placa bacteriana e a uma resposta inflamatória local. A DP foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente.

No que diz respeito à perda óssea alveolar, induzida pela ligadura, esta pode ocorrer devido à ativação anormal do sistema imunológico do hospedeiro (TAKAYANAGI, 2005), como resultado entre o desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes, em favor de oxidantes ou excesso deles ou ainda, diminuição de antioxidantes, que ocasionarão o estresse oxidativo (KARA et al., 2013).

A associação de estresse oxidativo sistêmico e doença periodontal em humanos e animais experimentais foi explorada em uma revisão de literatura por Tomofuji et al. (2009), que citam relatos ligando diretamente a produção de oxidantes nos sítios com lesões inflamatórias periodontais e injúrias em vários órgãos vitais.

Em animais, a associação entre produção de ERO/ERN em sítios de periodontite induzida está bem estabelecida. Com uso de um modelo experimental induzido por aplicação tópica na gengiva de lipopolissacarídeo e de proteases específicas, Tomofuji et al. (2007) mostraram clara correlação entre a gravidade da DP e lesões oxidativas nos tecidos hepáticos e na aorta descendente. Este estresse oxidativo pode ser avaliado através de várias formas, como mensuração dos níveis de ERO, danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, e também detecção dos níveis de antioxidantes (YAGAN et al., 2013; NIKI, 2012).

Neste contexto, no modelo experimental proposto, avaliou-se a concentração de glutathiona reduzida (GSH), antioxidante endógeno. Verificou-se que seus níveis sofreram um decréscimo significativo em relação ao grupo basal, caracterizando a instalação de danos oxidativos no modelo proposto, pela redução da concentração da defesa antioxidante do hospedeiro com periodontite experimental, o mesmo observado por Battino et al. (1999) e Kara et al. (2013). Além disso, foi possível observar que o tratamento com Sinvastatina e Laserterapia foram eficientes na prevenção da diminuição dos valores de GSH ($p < 0,05$).

Outro método muito utilizado na determinação da ocorrência de danos oxidativos nos tecidos, mediados por ERO, é a mensuração dos produtos finais da peroxidação de lipídeos, o MDA (YAGAN et al., 2013). Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre a periodontite e o aumento do MDA, tanto no fluido gengival crevicular quanto na saliva e amostras de tecido gengival (KARA et al., 2013; WEI et al., 2010; TOMOFUJI et al., 2009). No presente estudo, encontrou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo S tratado com RAR/LIB aos 7 dias, não sendo portanto um bom marcador de estresse oxidativo. Esse resultado contradiz outros trabalhos (YAGAN et al., 2013; CARVALHO et al., 2013; KARA et al., 2013), que relatam que a peroxidação lipídica é um exemplo muito frequente de estresse oxidativo na periodontite induzida, e o seu aumento tem um papel importante na progressão da destruição periodontal (KARA et al., 2013). Esta possível diferença pode estar associada com a metodologia utilizada para detecção deste produto da peroxidação lipídica, já que o estudo utilizou um método específico e sensível, cromatografia líquida de alta eficiência, enquanto outros autores utilizam o método de TBARS, menos sensível e inespecífico.

A análise de CPO, é outra maneira de se verificar a presença de danos oxidativos em tecidos com alterações mediadas por processos inflamatórios. Neste modelo, observou-se que o aumento de CPO foi maior no grupo C do que no S ($p < 0,05$); provavelmente isso foi detectado por se tratar de uma ação de proteção mediada pela Sinvastatina. Quando se associou o LBI como coadjuvante, essa proteção foi ainda maior ($p < 0,05$).

Em humanos, alguns trabalhos estabeleceram que a periodontite crônica está diretamente correlacionada à alta ocorrência de danos oxidativos em proteínas, determinado pela medida de CPO sérica, bem como o aumento do estado oxidativo total

e de produtos de lipoperoxidação, quantificados como MDA (PANJAMURTHY et al., 2005; BALTACIOGLU et al., 2008).

Na análise radiográfica, os animais do grupo C e S apresentaram uma PO significativamente maior no tratamento RAR comparado ao RAR/LIB, em todos os períodos experimentais. Esses resultados demonstram que a RAR não foi eficaz para controlar a perda óssea na área de mesial dos dentes destes animais. Clinicamente, é provado que a RAR com instrumentos manuais fornece os melhores resultados para o tratamento da DP (LINDHE et al., 1982). No entanto, diversos fatores podem limitar o sucesso da RAR, tais como concavidades radiculares, apinhamento dentário, áreas profundas, zonas de bifurcação que dificultam o acesso dos instrumentos manuais na bolsa periodontal. Devido a esses fatores anatômicos limitantes, terapias coadjuvantes ao tratamento convencional têm sido propostas (ALMEIDA et al., 2008).

Diante disso, a escolha pela Sinvastatina, no presente estudo, ocorreu uma vez que as estatinas apresentam efeitos variados no osso, como aumento da sua formação, sendo que a Lovastatina e a Pravastatina exibem um menor efeito, enquanto que a Sinvastatina, Atorvastatina e a Cerivastatina exercem efeitos maiores (BAEK et al., 2005). Além disso, destaca-se por atuar em eventos importantes durante uma resposta inflamatória exacerbada.

Na análise intergrupo, observou-se que o grupo C teve uma PO significativamente maior que o grupo S aos 7 dias, com tratamento RAR. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos (VARIZI et al., 2007; LINDY, 2008; DALCICO et al., 2013).

Segundo Luan et al., 2003, as estatinas diminuem a produção de muitas citocinas pró-inflamatórias e, também tem sido descrito que favorecem a diminuição da secreção de MMP-1 (metaloproteinases de matriz - 1), MMP-2, MMP-3 e MMP-9 in vitro. Dessa forma, estas poderiam reduzir a resposta imunológica forte, protegendo contra a destruição do tecido periodontal (SAXLIN, 2009).

Nas análises radiográficas inter e intragrupos, observou-se que quando se realizou o tratamento RAR/LIB, os níveis de PO foram significativamente menores, em todos os períodos experimentais, confirmando trabalhos anteriores (TOMASI et al., 2006; LOPES et al., 2008; GARCIA et al., 2010), que demonstram um melhor resultado do tratamento periodontal com essa associação, por estimular a formação óssea (GARCIA et al., 2013).

Alguns estudos têm relatado que a utilização da fonte de luz por meio de laser inibe a produção de mediadores inflamatórios por células do ligamento periodontal (SAITO et al., 1991), favorece a quimiotaxia celular (HOURELD et al., 2007), promove vasodilatação e angiogênese local e, dessa forma, poderia haver um aumento na difusão de oxigênio no tecido, favorecendo o processo de reparo, pois a secreção do colágeno pelos fibroblastos no espaço extracelular ocorre somente na presença de altas taxas de pressão de oxigênio (REENSTRA et al., 2001).

No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado não existir diferenças entre o tratamento convencional e a utilização associada do LBI (MIYAZAKI et al., 2003; LIN et al., 2011). Essas evidências conflitantes podem ser devido às diferenças metodológicas na utilização do laser e dos diferentes parâmetros de irradiação utilizados.

Em uma análise global, os resultados bioquímicos e radiográficos apontam para a possibilidade do uso da laserterapia e de estatinas como moduladores do processo inflamatório associado à DP. Essa patologia é considerada uma enfermidade inflamatório-imunológica de natureza multifatorial, e os dados reforçam o conceito de que danos teciduais resultam de uma complexa interação entre microrganismos e respostas do hospedeiro.

A Odontologia almeja que, além de dentes saudáveis, a população tenha melhor qualidade de vida. Assim, estudos que visam controlar com maior eficiência a doença periodontal são essenciais para manter a saúde bucal e sistêmica dos indivíduos. O uso adequado de compostos coadjuvantes que acelerem e incrementem a eficiência dos tratamentos clínicos já estabelecidos é, assim, de importância central no processo saúde-doença periodontal.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a periodontite experimental em ratos induziu o estresse oxidativo caracterizado pelo decréscimo dos níveis de glutathiona reduzida e aumento dos níveis de proteínas carboniladas.

A terapia laser em baixa intensidade foi efetiva na proteção dos danos oxidativos bem como na perda óssea da superfície mesial dos primeiros molares. Enquanto que a Sinvastatina foi efetiva apenas como antioxidante, não apresentando efeito na reabsorção óssea.

REFERÊNCIAS

1. ADRIAENS, P. A. et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J Periodontol**, v. 59, n. 8, p. 493-503, 1988.
2. ADUSE-OPOKU, J. et al. Characterisation, genetic analysis, and expression of a protease antigen (PrpPI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4744-4754, 1995.
3. AKMAN, S. et al. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. **J Periodontol**, v. 84, n. 5, p. 666-674, 2013.
4. ALMEIDA, J. M. et al. Radiographic evaluation of the alveolar bone tissue after induction of periodontal disease in rats. **R Periodontia**, v. 17, n. 4, p. 24-30, 2007.
5. ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol**, v. 79, n. 11, p. 2156-2165, 2008.
6. ANDREANA, S. The use of diode lasers in periodontal therapy: literature review and suggested technique. **Dent Today**, v. 24, n. 11, p. 130, 132-135, 2005.
7. AOKI, A. et al. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. **Periodontol 2000**, v. 36, p. 59-97, 2004.
8. ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
9. BAEK, K. H. et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. **J Korean Med Sci**, v. 20, n. 3, p. 438-444, 2005.
10. BALTACIOGLU, E. et al. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 8, p. 716-722, 2008.
11. BARSANTE, M.M. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, v. 516, n. 3, p. 282-289, 2005.
12. BASFORD, J. R. Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? **Mayo Clin Proc**, v. 61, n. 8, p. 671-675, 1986.

13. BATTINO, M. et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 10, n. 4, p. 458-476, 1999.
14. BERGENDI, L. et al. **Chemistry, physiology and pathology of free radicals**. Life Sciences, Elmsford, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.
15. BEZERRA, M.M. et al. Selective Cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.
16. BOTELHO, M. A. et al. Lippia sidoides and Myradruon urundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 113, n. 3, p. 471-478, 2007.
17. BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
18. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
19. BREIVIK, T. et al. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 1, p. 23-32, 2006.
20. BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.
21. BUDUNELI, E. et al. Matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of MMP-1 and laminin-5 γ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. **J Periodontol**, v. 78, n. 1, p. 127-134, 2007.
22. CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu Rev Biochem**, v. 58, p. 79-110.1989.
23. CANACKI, C.F. et al. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. **J Periodontol**, v. 77, n. 11, p. 1894-1900, 2006.
24. CANACKI, C.F.; CICEK, Y.; CANACKI, V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, p. 619-628, 2005.
25. CARVALHO, R. S. et al. Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 1, p. 50-58, 2013.

26. CASTRO, G. L. et al. Histological evaluation of the use of diode laser as an adjunct to traditional periodontal treatment. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 1, p. 64-68, 2006.
27. CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Rev Bras Patol Oral**, v. 3, n. 4, p. 214-218, 2004.
28. CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J. B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontol 2000**, v. 43, p. 160-232, 2007.
29. COBB, C. M. Lasers in periodontics: A review of the literature. **J Periodontol**, v. 77, n. 4, p. 545-564, 2006.
30. CUNHA-CRUZ, J. et al. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 77, n. 6, p. 1061-1066, 2006.
31. DALCICO, R. et al. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. **J Periodontol**, v. 84, n. 8, p. 1145-1157; 2013.
32. DE MICHELI, G. et al. **Periodontia: a atuação clínica baseada em evidências científicas**. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
33. FIEHN, N. E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R. T. Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. **J Periodontol Res**, v.27, n. 6, p. 609-614, 1992.
34. FREITAS, L. G. F.; BARANAUSKAS, V., CRUZHÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, v. 154-155, p. 548-554, 2000.
35. FRENKEL, J. K. Pathology society symposium on choice of animal models for the study of disease processes in man. Introduction. **Fed Proc**, v. 28, p. 160-215, 1969.
36. GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.
37. GALVÃO, M. P. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003.
38. GARCIA, V. G. et al. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 2, p. 197-206, 2010.
39. GARCIA, V. G. et al. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in rat calvaria. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 407-414, 2013.

40. GILLESPIE, M. J. et al. Isolation and partial characterization of the *Campylobacter rectus* cytotoxin. **Microb Pathog**, v. 14, n. 3, p. 203-215, 1993.
41. HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007.
42. HEIJLL, L.; RIFKIN, B. R.; ZANDER, H. A. Conversion of chronic gingivitis to periodontitis in squirrel monkeys. **J Periodontol**, v. 47, n. 12, p. 710-716, 1976.
43. HORIUCHI, N.; MAEDA, T. Statins and bone metabolism. **Oral Dis**, v. 12, n. 2, p. 85-101, 2006.
44. HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 2, p. 78-84, 2007.
45. IZUMO, N. et al. Lipophilic statins can be osteogenic by promoting osteoblastic calcification in a Cbfa1- and BMP-2-independent manner. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 23, n. 7, p. 389-394, 2001.
46. JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufhat administration on the periodontium of the rat. **J Periodontal Res**, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.
47. JUNQUEIRA, J. C. et al. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. **J Oral Sci**, v. 44, n. 3-4, p. 117-124, 2002.
48. KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. **J Periodontol**, v. 64, n. 4, p. 243-253, 1993.
49. KAMMA, J. J.; SLOTS, J. Herpes virus bacterial interaction in aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 5, p. 420-426, 2003.
50. KARA, A. et al. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 55, p. 21-26, 2013.
51. KARIM, S. et al. Superoxide dismutase enzyme and thiol antioxidants in gingival crevicular fluid and saliva. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 9, n. 3, p. 266-272, 2012.
52. KARU, T.I. Photobiology of low - power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691- 704, 1989.
53. KIENER, P.A. et al. Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 1, p. 105-118, 2001.

54. KIM, S. C. et al. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. **J Periodontal Implant Sci.** v. 40, n. 4, p. 164-171, 2010.
55. KLAUSEN B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v. 62, n. 1, p. 59-73, 1991.
56. KÖMERIK, N. In vitro killing of *Porphyromonas gingivalis* by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.
57. KONOPKA, T. et al. Total antioxidant status and 8-hydroxy-20-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Arch Immunol Ther Exp (Watsz)**, v. 55, n. 6, p. 1-7, 2007.
58. KRONMANN, L.; HATFIELD, C.; KRONMANN, K. Statin therapy: not just used to lower cholesterol? **Crit Care Nurs Q**, v. 30, n. 2, p. 154-160, 2007.
59. KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 2, p. 101-106, 2004.
60. LIN, J. et al. Gingival urettage study comparing a laser treatment to hand instruments. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 1, p. 7-11, 2011.
61. LINDHE, J. et al. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 2, p. 115-128, 1982.
62. LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 5. ed. Guanabara Koogan, 2010.
63. LINDHE, J.; NYMAN, S. Clinical trials in periodontal therapy. **J Periodontal Res**, v. 22, n. 3, p. 217-221, 1987.
64. LINDY, O. et al. Statin use is associated with fewer periodontal lesions: a retrospective study. **BMC Oral Health**, v. 8, p.16, 2008. doi: 10.1186/1472-6831-8-16.
65. LISTGARTEN, M. A. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. **J Periodont Res**, v. 22, n. 3, p. 172-178, 1987.
66. LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.
67. LIZARELLI, R. F. Z.; LAMARO-CARVALHO, T. L.; BRENTGANI, L. G. Histometrical evaluation of the healing of the dental alveolus in rats after irradiation with a lowpowered GaAlAs laser. In: FEATHESTONE, J. D. B, (ed.) et al. **Lasers in Dentistry V. Bellingham**: SPIE, 1999, p.49-56. (Proc. Spie v. 3593).

68. LOPES, B. M. et al. Short-term clinical and immunologic effects of scaling and root planning with Er: YAG laser in chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 79, n. 7, p. 1158-1167, 2008.
69. LUAN, Z.; CHASE, A. J.; NEWBY, A. C. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 5, p. 769-775, 2003.
70. MACHTEI, E. E. et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 6, p. 374-380, 1999.
71. MALUF, A. P. et al. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores. **RGO**, v. 54, n. 2, p. 182-184, 2006.
72. MARUYAMA T. et al. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. **Arch Oral Biol**, v. 56, n.1, p. 48-53, 2011.
73. MATIA, J. I. et al. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. **Int J Periodontics Restorative Dent**. v. 38, n. 6, p. 24-35, 1986.
74. MIDDA, M. The use of lasers in periodontology. **Curr Opin Dent**, v. 2, p. 104-108, 1992.
75. MIYAZAKI, A. et al. Effects of Nd:YAG and CO2 laser treatment and ultrasonic scaling on periodontal pockets of chronic periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 74, n. 2, p. 175-180, 2003.
76. MORITZ, A. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. **Lasers Surg Med**, v. 22, n. 5, p. 302-311, 1998.
77. MORRIS, M. S. et al. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1465-1473, 2008.
78. MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946-1949, 1999.
79. NAKAJIMA, T. et al. Periodontitis associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. **J Periodontol Res**, v. 45, n. 1, p. 116-122, 2010.
80. NICHOLLS, S.J. et al. Effects of obesity on lipid-lowering, anti-inflammatory, and antiatherosclerotic benefits of atorvastatin or pravastatin in patients with coronary artery disease (from the REVERSAL Study). **Am J Cardiol**, v. 97, n. 11, p. 1553-1557, 2006.
81. NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Lett**, v. 586, p. 3767-3770, 2012.

82. OHNO, T. et al. Skeletal reconstruction by vascularized allogenic bone transplantation: effects of statin in rats. **Transplantation**, v. 76, n. 5, p. 869 - 871, 2003.
83. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. **Basel**: Karger, p. 71-106, 1982.
84. PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cell Mol Biol Lett**, v. 10, n. 2, p. 255-264, 2005.
85. PETERSEN, P. E., OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J Periodontol**, v. 76, n. 12, p. 2187-2193, 2005.
86. POSTEN, W. et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg**, v. 31, n. 3, p. 334-339, 2005.
87. PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free Radicals**: A practical approach. New York: Oxford Press.1996.
88. RAMS, T. E.; SLOTS, J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol 2000**, v. 10, n. 1, p. 139 - 159, 1996.
89. REENSTRA, W.R. et al. Decrease proliferation and cellular signaling in primary dermal fibroblasts derived from diabetics versus non diabetic sibling controls. **Acad Emerg Med.**, v. 8, p. 519, 2001.
90. RIBEIRO, M. S. **Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele.** 2000.184f. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisa Nuclear, IPEN/USP, São Paulo, 2000.
91. RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
92. ROCHA JUNIOR, A. M. et al. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **J Vasc Bras**, v. 6, n. 3, p. 258-266, 2007.
93. SAITO, S. et al. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. **J Dent Res**, v. 70, n. 1, p. 27-33, 1991.
94. SALLAY, K. et al. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. **Infect Immun**, v. 43, n. 3, p. 1091-1093, 1984.
95. SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J Periodont Res**, v. 17, n. 3, p. 263-274, 1982.

96. SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. Effects of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 25, n. 5, p. 308-315, 1990.
97. SAXLIN, T. et al. Dual effect of statin medication on the periodontium. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 12, p. 997-1003, 2009.
98. SCHROEDER, H. E.; LINDHE, J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 20, n. 12, p. 775-782, 1975.
99. SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.
100. TAKATA, T. et al. Penetration and uptake of colloidal goldlabeled concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. **J Periodontol**, v. 59, n. 12, p.823-829, 1988.
101. TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodont Res**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.
102. TANNER, A. C. R.; SOCRANSKY, S. S.; GOODSON, J. M. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. **J Periodontol Res**, v. 19, n. 3, p. 279-291, 1984.
103. TOMASI, C. et al. Short term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with an Er:YAG laser during periodontal maintenance. **J Periodontol**, v. 77, n. 1, p. 111-118, 2006.
104. TOMOFUJI, T. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 1999-2006, 2007.
105. TOMOFUJI, T. et al. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. **J Periodontol**, v. 80, p. 1799-17808, 2009.
106. TONGUC, M. O. et al. The impact of smoking status on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels in chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 82, n. 9, p. 1320-1328, 2011.
107. VARIZI, H. et al. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **J Periodontol**, v. 78, n. 8, p. 1561-1567, 2007.
108. WEI, D. et al. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. **Aust Dent J**, v. 55, p. 70-78, 2010.

109. YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of Low-Dose Doxycycline on Serum Oxidative Status, Gingival Antioxidant Levels and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. **J Periodontol**, 2013 Jun 20. doi:10.1902.
110. YAZAWA, H. et al. Simvastatin promotes cell metabolism, proliferation, and osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 295 - 302, 2005.

ANEXOS**Anexo A****Parecer consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 19 de dezembro de 2012.

Prof. Leandro Araújo Fernandes

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº **472/2012**, intitulado “Tratamento da doença periodontal experimental com laserterapia em ratos modificados com sinvastatina” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e **aprovado** por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.



Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG