

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BIANCA FERNANDA ESPÓBITO SANTOS

**EFEITOS DA ESTATINA COMO COADJUVANTE AO TRATAMENTO
CONVENCIONAL DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

ALFENAS/MG

2016

BIANCA FERNANDA ESPÓSITO SANTOS

**EFEITOS DA ESTATINA COMO COADJUVANTE AO TRATAMENTO
CONVENCIONAL DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes.

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

ALFENAS/MG

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Bianca Fernanda Espósito.

Efeitos da estatina como coadjuvante ao tratamento convencional da doença periodontal induzida em ratos. / Bianca Fernanda Espósito Santos. -- Alfenas/MG, 2016.

56 f.

Orientador: Leandro Araújo Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Perda do Osso Alveolar. 3. Sinvastatina. I. Fernandes, Leandro Araújo. II. Título.

CDD-617.63



Bianca Fernanda Espósito Santos

“Efeitos da estatina como coadjuvante ao tratamento convencional da doença periodontal induzida em ratos”

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: 13/04/2016

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes

Instituição: UNIFAL-MG

Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Leandro Araújo Fernandes

Profa. Dra. Letícia Monteiro de Barros

Instituição: UNIFENAS

Universidade José do Rosário Vellano

Assinatura: Letícia Monteiro de Barros

Prof. Dr. Roberto Martins Lourenço

Instituição: UNIFAL-MG

Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: Roberto Martins Lourenço

Dedico a Deus, aos meus pais,
e ao meu namorado pelo apoio
na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Alfenas**, na pessoa do **Reitor Professor Dr. Paulo Márcio de Faria e Silva**;

À Faculdade de Odontologia da Unifal-MG, na pessoa do Diretor Professor **Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior**, pela oportunidade acadêmica, a Coordenadora do curso **Professora Dra. Daniela Coelho de Lima**, que apesar de seu vasto conhecimento na área da saúde e acadêmica, sempre teve humildade e tato em me passar os ensinamentos, contribuiu muito para minha formação, me deu apoio em diversas situações formais e informais, e me trazia muita segurança, muito obrigada, principalmente pela amizade construída;

A secretária do curso de Odontologia, **Neuza Aparecida Vieira**, pelo carinho e toda ajuda nessa fase;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa da Coordenadora Professora **Dra. Vivien Thiemy Sakai** pelo apoio à pesquisa, **Aos Docentes do programa** por contribuírem para minha formação, e aos funcionários; A **Capes** pela concessão de Bolsa de Estudo.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, **Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes**, pelos conhecimentos compartilhados, por ser um exemplo de dedicação, pelo suporte nesse estudo e acima de tudo pela paciência em me orientar, muito obrigada;

Aos **funcionários da Clínica Integrada I**, pela prestatividade e gentileza ao longo do mestrado;

À professora **Dra Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**, que generosamente contribuiu para a realização dessa pesquisa, ressaltando que este estudo foi concretizado com o seu apoio e dos técnicos do laboratório de bioquímica, **Gabriel e George**, que pacientemente me instruíram, muito obrigada;

Ao **Prof. Dr. Roberto Martins Lourenço**, e aos **funcionários e técnicos da radiologia** da Unifal-MG pelo apoio na execução da fase radiológica deste estudo e principalmente pela amizade;

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Julio Mesquita Filho (UNESP)** agradeço pela disponibilidade em realizar o processamento histológico das peças desta pesquisa;

Aos **Funcionários do Biotério da Unifal**, pelas instruções e pelo suporte na realização da parte cirúrgica da pesquisa e aos **animais** que perderam suas vidas para que este estudo se concretizasse;

Aos **Amigos discentes da pós-graduação**, em especial aos da **3ª turma** pelo convívio, momentos partilhados, e ao **Eduardo Quintão** e ao **Geovane** por toda ajuda e companheirismo nessa fase.

Obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

Muito Obrigada.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos locais da estatina como coadjuvante ao tratamento de raspagem e alisamento radicular da doença periodontal induzida em ratos. O universo amostral da pesquisa foi composto por trinta e seis (36) ratos que foram divididos em 2 grupos de 18 animais cada. A doença periodontal foi induzida em todos os animais, utilizando-se um fio de algodão colocado na região dento - gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos. Após 7 dias da indução, a ligadura foi removida e os animais foram divididos em dois grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: Grupo Controle (C) - raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com gel controle; Grupo Sinvastatina (S) - RAR e irrigação com gel de Sinvastatina. Em cada grupo 6 animais foram eutanasiados aos 7, 15 e 30 dias pós tratamentos locais. Amostras de biópsias gengivais da região com ligadura foram processadas para análise da expressão de Metaloproteinase de Matriz 8 (MMP-8). As mandíbulas foram removidas e seccionadas ao meio para análise radiográfica e posteriormente processadas laboratorialmente para a análise histométrica. Foi observado que os animais do grupo C apresentaram uma expressão de MMP-8 significativamente maior comparado aos do grupo S em todos os períodos experimentais. Na expressão de MMP-8 intra grupos, os animais de ambos os grupos apresentaram uma expressão significativamente maior aos 7 do que aos 30 dias. Nas análises radiográficas e histométrica entre os grupos, os animais do grupo C apresentaram uma perda óssea (PO) significativamente maior comparado aos do grupo S em todos os períodos experimentais. Na análise radiográfica intra grupos, os animais do grupo C apresentaram uma PO significativamente maior aos 7 dias do que aos 30 dias. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a estatina aplicada localmente foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na doença periodontal induzida em ratos.

Palavras-chaves: Periodontite. Perda Óssea Alveolar. Sinvastatina.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the local effects of statins as adjuvant treatment of scaling and root planing of periodontal disease induced in rats. The sample of the survey universe was composed for thirty-six (36) mice were divided into 2 groups of 18 animals each. Periodontal disease was induced in all animals using a cotton yarn placed in the region dento - gingival left of the first molars. After 7 days of induction, the ligature was removed, and the animals were divided into two groups according to the following local treatments: Control Group (C) - scaling and root planing (SRP) and with irrigation control gel; Simvastatin Group (S) - and RAR irrigation gel simvastatin. In each group 6 animals were euthanized at 7, 15 and 30 days post local treatments. Samples of gingival biopsies were processed with ligation region for analysis of expression of Matrix metalloproteinase 8 (MMP-8). The jaws were removed and sectioned in half to radiographic and laboratory subsequently processed for histometric analysis. It was observed that the group C had a significantly higher MMP-8 expression compared to the S group in all experimental periods. The expression of MMP-8 intra groups, the animals of both groups showed a significantly higher expression than 7 to 30 days. In the radiographic and histometric analysis between the groups, the group C showed a bone loss (PO) significantly higher compared to the S group in all experimental periods. In radiographic intra groups, group C had a significantly higher PO at 7 days than at 30 days. Within the limits of this study, it can be concluded that Statin applied locally was effective as adjuvant treatment to the SRP induced periodontal disease in rats.

Keywords: Periodontitis. Alveolar Bone Loss. Simvastatin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Delineamento do estudo e períodos experimentais.....	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 -	Seringas hipodérmicas para irrigação local com os géis.....	29
FIGURA 9 -	Aplicação do gel Controle após RAR e do gel de Sinvastatina após RAR.....	29
FIGURA 10 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 7 dias.....	35
FIGURA 11 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 15 dias.....	35
FIGURA 12 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 30 dias.....	36
FIGURA 13 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 7 dias.....	36
FIGURA 14 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 15 dias.....	36
FIGURA 15 -	Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 30 dias.....	36

FIGURA 16 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 7 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	37
FIGURA 17 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 15 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	38
FIGURA 18 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 30 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	38
FIGURA 19 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 7 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	39
FIGURA 20 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 15 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	39
FIGURA 21 -	Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 30 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios padrões (M±DP) da expressão em unidades de MMP-8 no tecido conjuntivo gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período.....	34
Tabela 2 - 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 e período.....	35
Tabela 3 - Médias e desvios padrões (M±DP) dos dados histométricos da PO (mm ²) na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP- 2 -	Proteína óssea morfogenética 2
CEUA -	Comissão de ética no uso de animais
C -	Controle
CBFA 1	Núcleo fator de ligação de alfa-1
COBEA -	Colégio brasileiro de experimentação animal
DP -	Doença periodontal
FCG -	Fluido Crevicular Gengival
FGF - 2 -	Fator de crescimento fibroblástico 2
FMD	Desinfecção completa da boca
HE	Hematoxilina - Eosina
HMG-CoA -	3 – hidroxil – 3 – metil – glutaril – coenzima A
IF- γ -	Interferon gama
IL -1 BETA -	Interleucina 1 Beta
MMPs -	Metaloproteinases de Matriz
MMP-8 -	Metaloproteinase de matriz 8
MMP-9 -	Metaloproteinase de matriz 9
MMP-13 -	Metaloproteinase de matriz 13
MN -	Monócito
OPG	Osteoprotegerina
PGE2 -	Prostaglandina E2

PO -	Perda óssea
PMN -	Polimormofonuclear
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANK-L	Ligante do receptor do fator nuclear kapa B
RAR -	Raspagem e alisamento radicular
S -	Sinvastatina
SMAD -	Proteínas modeladoras do fator de crescimento transformante
SMAD3 -	Proteínas modeladoras do fator de crescimento transformante 3
TGF-β1 -	Fator de crescimento transformador beta 1
TIMP -	Inibidores de metaloproteinases de matriz
TNF – α -	Fator de necrose tumoral α
VEGF -	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL.....	12
2.2	PAPEL DA MMP-8 NA DOENÇA PERIODONTAL.....	15
2.3	TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	16
2.4	MÉTODOS COADJUVANTES NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	18
2.5	EFEITO DA SINVASTATINA NO METABOLISMO ÓSSEO.....	19
2.6	ESTATINAS COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE.....	21
2.7	ADMINISTRAÇÃO DAS ESTATINAS LOCALMENTE AO TECIDO.....	22
3	OBJETIVOS.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA.....	26
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	26
4.3	PERÍODOS EXPERIMENTAIS.....	27
4.4	INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL.....	28
4.5	TRATAMENTO LOCAL.....	29
4.6	PREPARO DO TAMPÃO PARA CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GENGIVAL.....	30
4.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA TOTAL.....	30
4.8	ANÁLISE DE MMP-8 NAS AMOSTRAS DE TECIDO GENGIVAL.....	31
4.9	TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL.....	32
4.10	PROCESSAMENTO LABORATORIAL E ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....	32
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	ANÁLISE DA MMP-8 NO TECIDO GENGIVAL.....	34
5.2	ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	35
5.3	ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....	36
6	DISCUSSÃO.....	41

7	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO.....	56

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma infecção crônica, produzida por bactérias gram-negativas, com níveis de prevalência elevados (PETERSEN et al., 2012). Ocorre na gengiva em resposta a antígenos bacterianos da placa dentária que se acumulam ao longo da margem gengival. Sua manifestação inicial é a gengivite, caracterizada por uma série de condições inflamatórias, hiperemia, edema e também recessão e sangramento gengival. Se não tratada precocemente, ela pode evoluir para periodontite (LIU et al., 2012).

A clivagem inicial dos colágenos tipo I e III, produzidos pelos fibroblastos do ligamento periodontal e gengiva, componentes predominantes da matriz extracelular do periodonto, é peça chave das lesões periodontais progressivas e ativas causada por colagenases intersticiais derivadas de células do hospedeiro (KIILI et al., 2002).

Essa degradação das fibras colágenas inseridas na raiz dentária é realizada por enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs), e assim permitem a migração apical e a extensão lateral do epitélio da bolsa. A seqüela clínica é o aumento patológico da destruição do colágeno com a perda de inserção e formação da bolsa periodontal (RYAN et al., 2000).

Segundo Sorsa et al. (1999), dentre as colagenases que participam desse processo, a metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8) é a principal colagenase intersticial no fluido crevicular gengival (FCG) de indivíduos com periodontite crônica e no fluido sulcular periimplantar de indivíduos com periimplantite, respondendo por 90-95% da atividade colagenolítica.

Tendo em vista esse processo, o tratamento da doença periodontal baseia-se na eliminação da microbiota subgengival 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; MATIA et al., 1986). Devido a estas limitações métodos coadjuvantes a terapia periodontal convencional tem sido estudados (DALCICO, 2013; TING et al., 2016). Considerando o papel proeminente do hospedeiro como principal componente da destruição de tecidos moles e duros, visto na periodontite, estratégias terapêuticas, como a farmacológica, tem se sobressaído como uma nova abordagem de tratamento (DALCICO, 2013; TING et al., 2016).

As estatinas são medicamentos largamente utilizados para a redução do colesterol, porém foi observada uma indução de formação óssea tanto em culturas de tecido, quanto em ratos e camundongos, fato que despertou enorme interesse na comunidade científica, pela possibilidade destas poderem ser utilizadas em patologias ósseas, como é o caso da doença periodontal (MUNDY et al., 1999).

Dentre as várias estatinas, tem-se a Sinvastatina, que tem sido amplamente utilizada na prática clínica, no controle dos níveis de colesterol. Com isso, além de sua função hipolipemiante, esta 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 (CUNHA-CRUZ et al., 2006; MUNDY et al., 1999). Tais propriedades oferecem grande potencial para as estatinas modificarem o curso de doenças inflamatórias crônicas (BARSANTE et al., 2005), dentre as quais podem ser incluídas as doenças periodontais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em algumas especialidades odontológicas, especialmente na periodontia, estudos sobre as estatinas têm despertado interesse, principalmente devido aos feitos positivos sobre a cicatrização óssea além dos benefícios já comprovados como a redução da hipercolesterolemia.

2.1 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

As doenças crônicas avançam em todas as regiões e permeiam todas as classes socioeconômicas. Dieta pouco saudável, má nutrição, sedentarismo, tabagismo, uso excessivo de álcool e estresse psicossocial são os fatores de risco mais importantes. A doença periodontal é um componente de carga global da doença crônica, tendo os mesmos fatores de riscos essenciais (PETERSEN et al., 2012).

A placa bacteriana (ou biofilme) é considerada a principal causa de doenças que acometem a boca, podendo se manifestar como cárie, periodontite, infecções peri-implante e estomatites. Quando a inflamação se restringe apenas ao tecido mole, denomina-se gengivite e quando há a perda de tecido de inserção do dente, tem-se a periodontite (CARRARO et al., 2008).

Uma das razões que pode determinar uma evolução da gengivite para periodontite é a presença de indicadores e fatores de risco. O tabagismo e o diabetes são os mais estudados e consagrados pela literatura (BERGSTROM, 2014). Além desses dois fatores, outros vêm sendo estudados: obesidade, álcool, osteoporose e fatores psicossociais (DICKIE DE CASTILHOS; THOMSON et al., 2012).

A definição de periodontite implica no acometimento do tecido ósseo e dos ligamentos periodontais. A evolução de gengivite para periodontite parece ocorrer por causa da composição da microbiota gengival (GMUR et al., 1994). Os sinais comuns presentes tanto na gengivite quanto na periodontite são a presença de sangramento, edema e aumento do fluido crevicular, que resultam da atividade inflamatória, intermediada por bactérias ou endotoxinas, e da resposta imunológica/humoral do hospedeiro com a presença de leucócitos

polimorfonucleares (PMNs), linfócitos, imunoglobulinas e sistema complemento (REGEZI et al., 2013).

Wiebe et al. (2000) descrevem o termo periodontite crônica e relatam que suas principais características foram definidas como tendo taxa de progressão leve a moderada, podendo ter períodos de progressão rápida, presença de irritantes locais compatíveis com a severidade da doença e de ocorrência maior em adultos, podendo acometer crianças e adolescentes.

Já a periodontite agressiva compreende um grupo de lesões caracterizadas por ocorrer em indivíduos geralmente saudáveis, com tendência genética à doença, cujas manifestações clínicas são caracterizadas por rápida perda de inserção e destruição óssea, que não condizem com a quantidade de acúmulo de placa (LINDHE et al., 2010). Armitage (2000) explica que outras características podem estar presentes, como, por exemplo, proporções elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ou *Porphyromonas gingivalis*, anomalias nos fagócitos, fenótipo de macrófagos com hiper-resposta com níveis elevados de prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina-1 beta.

Inicialmente as doenças periodontais surgem a partir da colonização da superfície dentária por bactérias, a princípio, predominantemente por microrganismos gram-positivos (colonização primária), tais como *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Veillonella parvula* e *Capnocytophaga ochracea* (BEREZOW et al., 2011).

A periodontite pertence a uma família de doenças relacionadas que diferem quanto à etiologia, história natural e resposta terapêutica, porém partilham do mesmo mecanismo de destruição do tecido conjuntivo e da perda óssea. Essa se inicia pela colonização bacteriana secundária (bactérias gram-negativas e anaeróbicas) sobre a superfície dentária e a subsequente formação de reação inflamatória (LINDHE et al., 2010).

Na colonização secundária, diferentes espécies de microrganismos (*Prevotella intermédia*, *Prevotella loescheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) se aderem às bactérias já existentes na placa bacteriana, alterando a concentração hidrogeniônica e a tensão do oxigênio, o que torna o meio ideal para proliferação de bactérias anaeróbicas (ARMITAGE et al., 2000).

Em relação aos sinais clínicos, o edema do tecido gengival e o sangramento presentes na periodontite podem levar à reabsorção óssea, verificada radiograficamente e seu estágio final é a perda do elemento dentário pela eliminação total do tecido de sustentação (LINDHE et al., 2010). A formação e o aumento da placa bacteriana responsáveis pela periodontite podem ser prevenidos facilmente com uma boa higiene oral. (WEIJDEN et al., 2011)

Apesar de numerosos mecanismos de defesa do hospedeiro serem recrutados para combater o ataque bacteriano no sulco gengival, evidências substanciais indicam que as células fagocíticas, especificamente os polimorfonucleares (PMN) e os monócitos (MN), constituem a via mais importante de defesa nesta área. Defeitos funcionais em células fagocíticas parecem predispor indivíduos para o desenvolvimento de periodontite grave. Acredita-se que as funções dos neutrófilos danificados, bem como a deficiência das funções de outras células da resposta do hospedeiro, se tornam o mecanismo central na progressão das formas de periodontite, tanto crônico como agressiva (KINANE et al., 2011).

No estudo realizado por Kumar et al. (2006), onde a resposta celular dos PMN e dos MN em pacientes com doença periodontal e pacientes saudáveis foi avaliada, observou-se que no grupo dos pacientes com doença periodontal agressiva a quimiotaxia de PMN e MN foi maior principalmente na periodontite agressiva, apesar deste processo acontecer em todas as formas de periodontite.

Embora o papel principal dos PMN seja a proteção, estes podem lançar uma gama de fatores que vão danificar os tecidos, incluindo espécies reativas de oxigênio, collagenases e outras proteases (KINANE et al., 2011).

Assim, sugere-se que os neutrófilos são os contribuintes para a progressão de formas de periodontite, através das suas funções deficientes ou elevadas. Entretanto, devemos levar em consideração que os neutrófilos, por si só, são apenas um dos componentes do sistema imunológico nos tecidos periodontais. No entanto, apesar destas dificuldades em determinar as vias inflamatórias e imunológicas nestas doenças, uma compreensão da função dos neutrófilos pode auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico e de tratamento (NATH et al., 2011).

Os fatores de virulência da placa bacteriana dependem da presença de microrganismos específicos que produzem substâncias inflamatórias mediadoras da destruição tecidual no hospedeiro (LINDHE et al., 2010). Na reação inflamatória, macrófagos, monócitos e células endoteliais produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 beta (IL-1 Beta), interferon gama (IF- γ) e TNF- α induzem o aumento da produção de prostaglandinas E2 (PGE2) e da metaloproteinases de matriz, que induzem à destruição extracelular da gengiva, do ligamento periodontal e estimulam a reabsorção do osso alveolar (KUMAR et al., 2006). Esses eventos também podem ser influenciados por fatores de risco ambientais ou genéticos, como estresse, (GENCO et al. 2013) diabetes (LAIN et al. 2013) e tabagismo (BULMANSKI et al. 2012).

A composição bacteriana da placa dental associada à periodontite é complexa nos adultos, envolvendo mais de 500 espécies microbianas diferentes, (HAJISHENGALLIS et al., 2011), porém, são três as principais bactérias responsáveis pela etiologia da DP: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que possuem a característica em comum de resistirem ao “clearance” do hospedeiro via eixo anticorpo-complemento/ neutrófilo, escapando da função fagocitária, o que poderia determinar a sua virulência e explicar a evolução da doença (LOOMER et al., 2004).

A placa bacteriana ou biofilme, ao destruir o epitélio da bolsa periodontal, rompe a barreira que a isola do tecido conjuntivo e conseqüentemente, da circulação, o que pode colocar elementos nocivos na corrente sanguínea (LOCKHART et al., 2012).

A DP cursa com ativação de células inflamatórias em efeito cascata, o que pode resultar em sequelas locais e efeitos sistêmicos importantes. Assim, quanto mais disseminada a infecção pelos tecidos de sustentação dentária, maior a área de exposição ao sistema do indivíduo como um todo (IGIC et al., 2012).

Com os avanços científicos dos últimos tempos, a fisiologia da DP é revista sob a ótica da bioquímica. Atualmente, presume-se que as alterações inflamatórias sejam causadas não somente por bactérias, posto serem essenciais para o desencadeamento do processo, porém insuficientes para justificar evolução clínica, mas também, a resposta do hospedeiro é determinante para a progressão (KINANE et al., 2011). O quadro clínico observado a partir da instalação da doença é resultado de uma complexa interação entre microrganismos, sua virulência e a resposta do hospedeiro (LOOMER et al., 2004).

2.2 PAPEL DA MMP-8 NA DOENÇA PERIODONTAL

As metaloproteinases da matriz (MMPs) desempenham um importante papel na remodelação do tecido conjuntivo durante o desenvolvimento, homeostase e cicatrização (LAUER-FIELDS et al., 2002).

Um desequilíbrio entre as MMPs ativadas e seus inibidores endógenos derivados do hospedeiro, os inibidores de metaloproteinase de matriz (TIMP), levam ao colapso patológico da matriz extracelular durante a doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; SÉEGUIER et al., 2000).

As MMPs são endopeptidases cálcio e zinco - dependentes que funcionam em pH neutro e coletivamente são capazes de degradar a maioria, se não todas, as moléculas da matriz extracelular. Essas enzimas guardam extensa homologia na sequência, mas diferem em termos de especificidade ao substrato e regulação transcricional (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993).

A MMP-8 destaca-se entre as MMPs predominantemente presentes no tecido gengival inflamado, FGC, saliva e fluido sulcular e periimplantar. O nível e grau de ativação desta enzima parece aumentar com o aumento da atividade e gravidade da doença periodontal e diminuir em seguida ao tratamento com raspagem e alisamento radicular (RAR) (LAUER-FIELDS et al., 2002).

Quando existe uma resposta imune deficiente, o organismo do hospedeiro não consegue eliminar os microorganismos patogênicos, perpetuando o processo inflamatório. A inflamação crônica produz radicais livres de oxigênio que ativam metaloproteinases, que degradam o colágeno do ligamento periodontal diminuindo a fixação do dente ao processo alveolar e aumentando a profundidade do sulco gengival. (KIILI et al., 2002).

A destruição irreversível dos tecidos periodontais normalmente associada ao aprofundamento do sulco gengival diferencia a periodontite da gengivite sendo refletida no FGC de sítios com lesão periodontal por altos níveis de MMP-8 ativa. Na gengivite pode haver níveis ligeiramente elevados de MMP-8 no FCG, mas ela estará na proforma latente e inativa. Durante a fase ativa da periodontite os níveis de MMP-8 ficam significativamente elevados e ela é quase completamente convertida para a forma ativa (SORSA et al., 1999).

2.3 TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

A remoção periódica de biofilme, cálculo e substâncias incorporadas ao cimento periodontal, por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR), é o tratamento periodontal mais eficaz para se obter uma superfície radicular limpa e compatível com a saúde dos tecidos periodontais (CARRARO et al., 2008). A aplicação dos procedimentos básicos não depende apenas do tipo de instrumento e das variações anatômicas dos dentes, mas da habilidade do profissional no uso e no conhecimento da função dos instrumentos periodontais (SOUZA et al., 2012).

Essa remoção do biofilme dental aderido é o principal objetivo das técnicas de RAR. A terapêutica convencional para tratamento de indivíduos com periodontite crônica é baseada na remoção mecânica de depósitos bacterianos, localizados supra e subgingivalmente, remoção de fatores de retenção e instruções de higiene oral (CARRARO et al., 2008).

Os procedimentos de RAR, apesar de não atuarem de maneira seletiva sobre os microrganismos relacionados à doença periodontal, são ainda hoje considerados fundamentais na terapia periodontal cirúrgica e não cirúrgica. No entanto, determinadas formas de doença periodontal ou determinados sítios podem não responder adequadamente ao tratamento mecânico convencional, devido à incompleta descontaminação da bolsa periodontal, à invasão bacteriana do tecido conjuntivo, ou à deficiência em mecanismos imunológicos de defesa frente à microbiota (PRETZL et al., 2009).

Essa abordagem através da RAR pode não ser suficiente para o tratamento da doença ou faz parte da fase inicial antes da terapêutica cirúrgica em casos de periodontite com bolsas profundas. O debridamento mecânico, pode ser realizado com instrumentação à mão ou com ultrassom (MATTHEWS, 2009).

Apenas a instrumentação periodontal é ineficaz para a completa eliminação do *A. actinomycetemcomitans*. Diversos tipos de tratamento já foram testados, mas os mais eficazes continuam sendo a orientação de higiene, a instrumentação mecânica (RAR) associada à terapia cirúrgica e à medicação sistêmica (WORCH et al., 2001).

A terapia periodontal não-cirúrgica envolve uma quantidade considerável de tempo, um alto nível de habilidade do operador e dedicação, e algum desconforto inevitável para o paciente (THONE-MUHLING et al., 2010).

O tratamento periodontal não-cirúrgico pode ser efetuado: por quadrantes em sessões semanais, ou em uma ou duas sessões no prazo de 24 horas denominado desinfecção total de boca (full mouth disinfection - FMD) (THONE-MUHLING et al., 2010).

A terapêutica de desinfecção total (full mouth disinfection) foi introduzida na prática clínica periodontal com o objetivo de melhorar os resultados obtidos por meio da RAR em indivíduos portadores de periodontite crônica, possibilitando uma diminuição nos valores de profundidade de sondagem e um ganho nos valores de inserção clínica (SANTANA et al., 2014).

A justificativa para a abordagem FMD é eliminar ou reduzir as bactérias patogênicas que podem levar à re-infecção de sítios já tratados (BEZERRA et al., 2015). Tendo como pontos positivos o menor número de sessões, facilitando a prática diária, no entanto, há controvérsias na literatura sobre a superioridade da FMD em relação à RAR em periodontites.

2.4 MÉTODOS COADJUVANTES NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

Nas últimas décadas uma grande variedade de agentes antimicrobianos de ação local ou sistêmica tem surgido com a finalidade de auxiliar no tratamento da doença periodontal, agindo como coadjuvantes do tratamento convencional (HEASMAN et al., 2011).

No caso de lesões periodontais, nem sempre o controle de placa é suficiente, pois certas bactérias predominantes da doença se alojam no tecido conjuntivo gengival e em outros sítios, ficando inacessível aos procedimentos de raspagem, mesmo com acesso cirúrgico. Deste modo a doença periodontal pode ser refratária e progredir (GENCO et al., 2013).

Existem sistemas de liberação local que constituem em um reservatório do antimicrobiano e de um veículo que controla o padrão de liberação do medicamento. O objetivo deste sistema é a manutenção de concentrações efetivas dos agentes quimioterápicos por longos períodos no sítio, a fim de reduzir a microbiota patogênica subgengival modular a resposta inflamatória do hospedeiro e dessa forma, minimizar os efeitos da destruição tecidual, mesmo havendo eliminação da droga através do fluido gengival que possui uma capacidade de renovação de 20 µl por hora (QUERIDO et al., 2003; SALVI, 2002).

Dentre os antimicrobianos locais muitos têm demonstrado eficácia clínica, especialmente em pacientes em terapia de manutenção e como complementares a RAR, a exemplo dos fármacos Metronidazol, Clorexidina e Tetraciclina (HEASMAN et al., 2011). No entanto essa afirmação não é unânime e alguns estudos sustentam o contrário (COSYN et al., 2005). Em associado, alguns aspectos como custo e acessibilidade vem sendo discutidos.

Administração local traria como vantagens a possibilidade de se obter concentrações mais elevadas da droga nos sítios subgengivais, com o emprego de doses inferiores e redução dos efeitos adversos resultantes da administração sistêmica, como náusea, vômito, cefaléia e desconforto gastrointestinal (GARIP et al., 2010).

Ainda sobre as vantagens de uma aplicação tópica, no caso dos antimicrobianos de ação local, apresentam vantagens como: podem atingir altas concentrações quando comparadas com os antibióticos de uso sistêmico; sua aplicação profissional independe da adesão e colaboração dos pacientes; não estão relacionados a eventos adversos relevantes, sobretudo no trato gastrointestinal ou no aparelho geniturinário, além de reduzir o risco de desenvolvimento de resistência a drogas pelas populações bacterianas existentes no corpo (MATESANZ-PÉREZ et al., 2013).

Por outro lado, estes dispositivos também possuem algumas desvantagens, que podem limitar ou até mesmo inviabilizar seu emprego, como: dificuldade em posicionar o agente antimicrobiano nas bolsas periodontais e lesões de furca; falta de colaboração, habilidade manual e de conhecimento anatômico por parte do paciente quando o agente é empregado em associação aos cuidados de higiene bucal domésticos; limitação quanto a uma única exposição, baixa substantividade das drogas; risco de reinfecção posterior e recorrência da doença em áreas já tratadas (HEASMAN et al., 2011).

É importante enfatizar que o emprego de antibióticos não constitui uma terapia substituta à instrumentação periodontal, pois as bactérias presentes no biofilme apresentam uma estrutura bastante organizada, podem sobreviver até mesmo em altas concentrações destas drogas (WALKER et al., 2002).

Surgiu-se então a necessidade de serem desenvolvidas substâncias tão efetivas quanto, mas que tentassem cobrir essas falhas. Recentes estudos como os de Cunha-Cruz et al. (2006) e Varizi et al. (2007), têm mostrado que a Sinvastatina tem ampla ação, possui atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de ser capaz de modificar o processo de perda óssea o que otimizaria o tratamento convencional da doença periodontal.

2.5 EFEITO DAS ESTATINAS NO METABOLISMO ÓSSEO

Estudos *in vitro* demonstraram que as estatinas hidrofóbicas incluindo as Sinvastatinas, Atorvastatinas, e Cerivastatinas aumentam consideravelmente a expressão do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, em células osteoblásticas não transformadas. Isto não ocorreu com as estatinas hidrofílicas, como as Pravastatinas (HOFFMAM et al.; 1986; MAEDA et al., 2004).

Segundo Hugues et al. (2007), as estatinas hidrofóbicas, Cerivastatina e Sinvastatina, são mais efetivas em inibir a reabsorção óssea do que as hidrofílicas, como a Rovastatina e a Pravastatina. As Sinvastatinas, por sua vez, são estatinas hábeis em aumentar a atividade da fosfatase alcalina, nível de expressão da osteocalcina e deposição de minerais em células humanas. Em cultura de *ex-vivo* e o seu efeito anabólico no osso acontece pela promoção da diferenciação osteoblástica (BAEK et al., 2005). A calciclina foi identificada em células obtidas de calvária de ratos como uma proteína que, quando induzida pela Sinvastatina, tem importante papel no efeito anabólico da Sinvastatina sobre o osso. Uma vez estimulada por

estatina, também pode funcionar como ativadora importante para a indução da produção de proteína óssea morfogenética, BMP-2, ou óxido nítrico, NO. (HWANG et al., 2004).

A Sinvastatina pode também afetar levemente o metabolismo celular e aumentar a diferenciação e a expressão de genes osteogênicos em células osteoblásticas alveolares primárias e células do ligamento periodontal. Isto foi relacionado ao seu potencial de promover a formação óssea alveolar e regeneração periodontal (LIU et al., 2012).

Em alguns estudos de aplicação local da Sinvastatina em animais foi verificado que este medicamento pode atuar no metabolismo ósseo favorecendo uma neoformação do tecido mineralizado (LIU; ALAM et al., 2009; NYAN et al., 2010;).

A Sinvastatina mantém alta a atividade da fosfatase alcalina e aumenta a formação de nódulos ósseos em células de forma dose dependente, mostrando que esta droga aumenta e mantém níveis altos da função osteoblástica (LIU et al., 2009). Achados histológicos mostraram que não somente osso alveolar, mas também ligamento periodontal e tecido conjuntivo podem ser restabelecidos com o uso de Sinvastatina (SETO et al., 2008).

Quando este medicamento foi aplicado adjacente ao periósteo mandibular de ratos, aumentou de forma significativa a atividade da BMP-2 e NO ao redor dos tecidos, confirmando a habilidade da Sinvastatina em estimulá-los *in vivo*, (BRADLEY et al., 2007).

Fukui et al. (2012) observaram ainda que a Sinvastatina favorece o aumento da angiogênese e osteogênese com recrutamento de células progenitoras endoteliais. A neovascularização e aumento da expressão do VEGF promovida pela Sinvastatina também foram observados por Oka et al. (2013) através de análises histológicas, imunohistoquímicas em seu estudo realizado em 45 coelhos.

Nas investigações *in vitro* e *in vivo* elaboradas por Zhou et al. (2010), observou-se que a Sinvastatina aumentou de forma significativa a expressão da BMP-2; do CBFA-1, fator de transcrição relacionada ao osso e essencial para a diferenciação dos osteoblastos em precursores mesenquimais e formação óssea, VEGF e FGF-2, fator de crescimento fibroblasto básico estimula a diferenciação de osteoblastos em um estágio precoce. Entretanto, houve dificuldade para se determinar o fator principal responsável pela diferenciação dos osteoblastos, uma vez que estes fatores agem mutuamente, um influenciando o outro. Constatou-se, ainda, que a expressão destes fatores pode ocorrer como resultado da ação direta da Sinvastatina ou via resposta secundária devido ao aumento de moléculas secundárias.

2.6 ESTATINAS COMO COADJUVANTES NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTITE

As estatinas constituem a classe de fármacos hipolipemiantes de maior prescrição na atualidade, diferindo entre si basicamente quanto a sua lipofilicidade e tempo de meia-vida (LLINGWORTH et al., 2001).

Essas drogas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a conversão do mevalonato, um intermediário importante no metabolismo do colesterol (ALAM et al., 2009; GARIP et al., 2010).

As estatinas podem levar a outros efeitos benéficos, quando o metabolismo do mevalonato é inibido, além da redução da hipercolesterolemia, como redução da inflamação, inibição da proliferação celular com propriedades anticarcinogênicas, estabilização de placas ateroscleróticas, redução do stress oxidativo, melhora da função endotelial, modulação da resposta imune, ajuda na cicatrização de lesões traumáticas cerebrais, lesões da medula espinhal cervical e ação no tecido ósseo (FUKUI et al., 2012; LEE et al., 2010; NASSAR et al., 2009).

Na periodontite, as estatinas podem estar relacionadas não só pelo seu papel em uma possível disfunção endotelial como também podem estar atuando de forma direta na diminuição da perda óssea alveolar (KIM et al., 2011; NASSAR et al., 2009; SAVER et al., 2007). Em um modelo experimental de periodontite foi avaliada que a aplicação tópica da Sinvastatina foi capaz de estimular a ativação da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) e de NO promovendo uma formação óssea alveolar em ratos (BRADLEY et al., 2007; RUAN et al., 2012).

Mundy et al. (1999) identificaram que as estatinas são um potente ativador da BMP-2, que é um estimulador importante da diferenciação osteoblástica *in vitro*. Estudos têm mostrado que a Sinvastatina e a Atorvastatina estimulam a transcrição de BMP-2 (CHEN et al., 2011; GOSH-CHOUDHURY et al., 2007).

O grau de solubilidade das estatinas está diretamente relacionado com seus efeitos secundários, sendo assim, as estatinas lipofílicas como, por exemplo, a Sinvastatina apresenta maior potencial osteogênico. Além disso, exercem maior influência na via dos monócitos que regulam a produção de citocinas, induzindo uma resposta inflamatória mais controlada, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando comparadas às hidrofílicas como a Atorvastatina e Fluvastatina (CHUENGSAAMAM et al., 2010).

Na última década, foi dada ênfase no efeito da droga no tecido ósseo (via inibição da via do mevalonato), sendo observado: expressão das proteínas morfogenéticas do osso (BMP-2), quando da sua administração local no tecido ósseo (MUNDY et al., 1999), efeito ósseo indutivo in vitro (MAEDA et al., 2003), estímulo à mineralização (BAEK et al., 2005) e diferenciação de células mesenquimais em novas células responsáveis pela neoformação óssea, além de a droga atuar em outras vias, como a do óxido nítrico (NASSAR et al., 2009).

Dados recentes sugerem que as estatinas podem influenciar a atividade metabólica óssea por suas ações em três moléculas: RANKL (Ligante do receptor do fator nuclear Kapa B); RANK (Receptor ativador do fator nuclear Kapa B), e Osteoprotegerina (OPG), conhecido como o receptor solúvel para RANKL (AHN et al., 2011; AYUKAWA et al., 2009). O RANKL interage com o seu receptor correspondente, RANK, que assim induz a sua ativação para reabsorção óssea (LACEY et al., 1998). Stein et al., 2011; determinaram os efeitos das estatinas na produção de OPG e RANKL. Ambas estatinas em estudo, Atorvastatina e a Sinvastatina, aumentaram a expressão de RANKL/OPG. Assim, estas estatinas podem influenciar a produção de RANKL e OPG e favorecer catabolismo ósseo, em condições não-inflamatórias (STEIN et al., 2011).

2.7 ADMINISTRAÇÃO DAS ESTATINAS LOCALMENTE AO TECIDO

A Sinvastatina quando administrada de forma sistêmica pode exercer um efeito adverso sobre os tecidos moles, principalmente sobre o tecido do nervo ciático e um efeito pleiotrópico (efeito benéfico) sobre o tecido ósseo (GARIP et al., 2010).

Doses de Sinvastatina de 30mg/Kg/dia podem ter um efeito negativo na cicatrização óssea, enquanto doses inferiores, na ordem de 10mg/kg/dia não exerceram qualquer efeito sobre a cicatrização óssea, especialmente nos estágios precoces de remodelação de fratura (CHISSAS et al., 2010).

Na literatura, existem estudos que verificaram efeito favorável ao uso sistêmico da Sinvastatina na regeneração óssea (ALAM et al., 2009; BAEK et al., 2005; BOSTAN; CHEN et al., 2011) Porém, isso só foi possível, através da utilização de doses elevadas (BOSTAN et al., 2011; CHISSAS et al., 2010), embora haja o risco de induzir mudanças na conformação protéica com efeitos adversos aos tecidos moles e ocasionar sintomas gastrointestinais, tais como náuseas, vômitos, constipação, dores abdominais e diarreia (GARIP et al., 2010).

As estatinas administradas oralmente, especialmente as hidrofílicas como a Pravastatina e Rovastatina, têm um alvo específico de atuação no fígado e, em doses padrão, não oferecem níveis de circulação suficientes para causarem efeito nos tecidos ósseos (HUGHES et al., 2007).

Apesar das investigações sobre a atividade anti-inflamatória das estatinas, estas eram administradas pela via oral. Em 2006, Otuki e colaboradores demonstraram que a Sinvastatina também possui ação anti-inflamatória tópica, e sugeriram a necessidade de se avaliar a eficácia e segurança da Sinvastatina em uma formulação e em tratamento crônico.

Estudos têm investigado os efeitos da administração sistêmica e aplicação local desta droga sobre a cicatrização óssea (AYUKAWA et al., 2009; CHEN et al., 2011; ELAVARASU; FUKUI et al., 2012). Alguns efeitos adversos da Sinvastatina podem surgir quando altas doses desse medicamento são aplicadas sistemicamente, aumentando o risco de falhas do fígado, doenças renais e danos aos tecidos musculares, enquanto baixas doses podem ser ineficientes para a cicatrização óssea (CHOU et al., 2013; SONDERGAARD et al., 2009).

Há evidências que as estatinas têm um efeito favorável à angiogênese quando utilizadas em baixas doses e um efeito contrário quando usadas em altas doses (ZHANG et al., 2008). Em contra partida, as estatinas administradas por via oral são mal distribuídas ao osso. Menos do que 5% de uma dose oral alcança a circulação sistêmica. As doses necessárias para ter um efeito sobre o osso são muito mais elevadas do que as necessárias para reduzir os níveis de colesterol, além de associadas à toxicidade inaceitáveis (YAMASHITA et al., 2008).

Diversos estudos sobre o uso local de Sinvastatina em doses variadas em diferentes carreadores obtiveram resultados favoráveis quanto à neoformação óssea, seja através de cirurgias (NYAN et al., 2014; OKA et al., 2013) ou injeções (CHEN et al., 2011; PRADEEP et al., 2010; PRADEEP et al., 2012) foi a que apresentou resultados mais uniformes e consistentes em relação à neoformação óssea comparada ao seu uso sistêmico que além de tudo, ainda têm a desvantagem dos efeitos colaterais. A forma injetável de ação local é defendida pelos autores acima como uma forma de utilização simples, conservadora e bastante promissora para alcançar a neoformação óssea com um mínimo de inchaço, inflamação e permitir a manutenção da integridade do periósteo- importante fonte de nutrição ao periodonto.

Atualmente os pesquisadores têm focado os seus estudos na ação local da Sinvastatina para neoformação óssea (FUKUI et al., 2012; OKA et al., 2013). Os efeitos pleitrópicos da ação tópica da Sinvastatina descritos por esses autores são: efeito antioxidante, anti-

inflamatório, aumento da angiogênese, aumento da expressão de VEGF, fatores de crescimento como- BMP-2, TGF- β 1 (fator transformador de crescimento beta 1), cicatrização óssea precoce, regeneração periodontal, osseointegração de implantes com osso maior contato osso/implante e melhor qualidade óssea, densidade óssea melhorada em osso osteoporótico, aumento da resistência óssea, maior formação óssea, diminuição da expressão do Rankl, proliferação, migração, recrutamento e diferenciação das células osteogênicas e subsequente formação de novo osso. Nassar et al. (2009) relatam que o efeito anti-inflamatório da Sinvastatina na presença de inflamação como no caso das doenças periodontais, este efeito pode ser explicado pelo fato desse fármaco talvez atuar na regulação da produção da interleucina 1 e prostaglandina E2.

A concentração local da droga no tecido pode ser favorecida pela incorporação do agente ativo deste fármaco dentro de um sistema de liberação controlado e ser aplicado diretamente no local da área que se deseja uma neoformação óssea (ELAVARASU et al., 2012).

A aplicação local deve ser simples e rápida, e em algumas situações a forma ideal de administração deve ser através de um gel o qual permite uma aplicação mais rápida e generalizada das áreas afetadas (PRADEEP et al., 2010; PRADEEP et al., 2012).

As vantagens da aplicação local somam-se a ausência de efeitos colaterais como mencionados com a utilização sistêmica desta droga. Segundo Elavarasu et al. (2012); O aspecto mais crítico é o método do sistema de liberação da droga pelo qual o ingrediente ativo da droga é liberado para o sítio de ação.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos locais da estatina como coadjuvante ao tratamento de raspagem e alisamento radicular da doença periodontal induzida em ratos.

4 MATERIAS 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, sob o nº 605/2014 do parecer substanciado (ANEXO A), seguindo as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1 DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 200 a 250g, com 2 a 3 meses de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Eles foram mantidos em condições padronizadas com água e ração ad libitum, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas e obedecendo aos critérios de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), da Unifal-MG.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO (FIGURA 1)

Decorridos 7 dias da indução e evolução da DP a ligadura foi removida. A seguir os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 18 animais cada de acordo com os seguintes tratamentos locais: Controle (C) – raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação com gel controle; Sinvastatina (S) – RAR e irrigação com gel de Sinvastatina.

Os procedimentos de RAR foram realizados com Cureta de Gracey Mini - Five 5 e 6 (Hu-Friedy MFG. Corporation. Inc. Chicago, USA). O gel Controle ou o gel de Sinvastatina foram depositados no interior das bolsas periodontais lentamente, utilizando seringa (1 ml) e agulha para insulina (13mmx 0,04mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sem bisel.

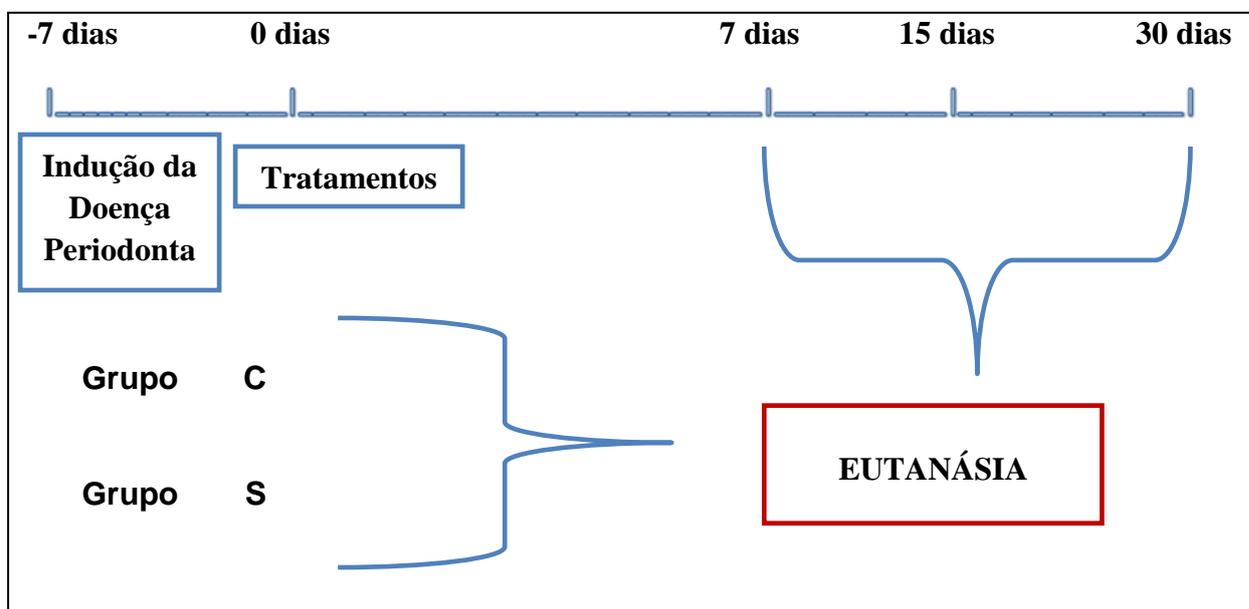
A estatina utilizada foi a Sinvastatina (Sinvastatina- Novartis - Brasil) e o seu preparo realizado através da diluição de comprimidos de 20 mg em 20 ml de natrosol (fabricado pela

farmácia de manipulação Pimpinella Cosméticos, CNPJ: 22.394.928/0001-30) obtendo uma concentração final de 1mg/mL.

4.3 PERÍODOS EXPERIMENTAIS (FIGURA 1)

Seis animais para cada grupo experimental foram eutanasiados por meio da câmara de dióxido de carbono, cujo uso reflete uma ausência de odor; rápida depressão do sistema nervoso central e ausência de resíduos no animal. As eutanásias foram realizadas aos 7, 15 e 30 dias pós tratamentos locais. Amostras de biópsias gengivais da região com ligadura foram processadas para a análise bioquímica, as mandíbulas foram removidas e seccionadas ao meio para a análise radiográfica e posteriormente processadas laboratorialmente para a análise histomorfométrica.

Figura 1- Delineamento do estudo e períodos experimentais.



Fonte: Da autora.

4.4 INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL (FIGURAS 2 a 5)

A Doença Periodontal foi experimentalmente induzida realizando-se previamente a anestesia dos animais através de injeção intramuscular, associando 0,14 ml/Kg de Cloridrato de quetamina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) a 0,06 ml/Kg de cloridrato de xilazina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) para os animais com até 225g e 0,18 ml/Kg de Cloridrato de quetamina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) a 0,08 ml/Kg de cloridrato de xilazina (Syntec do Brasil Ltda– Indústria brasileira) para os animais com até 250g. Com o auxílio de uma pinça modificada, adaptou-se um fio de algodão número 10 (Corrente Algodão nº10; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, mantidos em posição por meio de nós cirúrgicos (JOHNSON, 1975).

FIGURA 2- Animal posicionado na mesa operatória.



Fonte: Da autora

FIGURA 3- Pinça modificada utilizada para passagem do fio.



Fonte: Da autora

FIGURA 4- Posicionamento do fio.



Fonte: Da autora

FIGURA 5- Fio Posicionado.



Fonte: Da autora

4.5 TRATAMENTO LOCAL (FIGURAS 6 a 9)

Decorridos 7 dias da indução e evolução da DP, a ligadura foi removida dos animais. A seguir, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com os tratamentos locais: Controle (C) - raspagem, alisamento radicular e irrigação com 1 mL de gel de Natrosol (RAR); Sinvastatina (S) – RAR e irrigação com 1 mL de gel de Sinvastatina, no primeiro molar inferior esquerdo.

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 gel de Natrosol e de Sinvastatina foram depositadas lentamente no interior da bolsa periodontal, utilizando-se seringa (1 mL) e agulha para insulina (13mmx 0,04mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sem bisel.

FIGURA 6- Doença periodontal após 7 dias de indução.



Fonte: Da autora

FIGURA 7- Raspagem e alisamento radicular.



Fonte: Da autora

FIGURA 8- Seringas hipodérmicas para irrigação local com os géis.



Fonte: Da autora

FIGURA 9 - Aplicação do gel Controle após RAR e do gel de Sinvastatina após RAR.



Fonte: Da autora

4.6 PREPARO DO TAMPÃO PARA CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GENGIVAL

Para conservação das amostras até a realização das análises, foi confeccionado no laboratório de bioquímica da Unifal-MG, o Tampão Tris-HCl, em que primeiramente pesou-se 3,02 gramas de Tris (Hydroximethyl aminomethane - Sigma Aldrich, st. Louis, USA), 5,85 gramas de Cloreto de Sódio (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,555g de Cloreto de Cálcio (ACS proquímicos - Comércios de produtos químicos, Santa Maria, RS, Brasil), em balança analítica (Kern 410, Barlingen-Frommern).

Em seguida, completou-se o becker de 500 ml com água Mili-Q (Milipore- direct Q3 UV) até 250 ml, e o mesmo foi levado no agitador magnético (Fisatom – 115 V) com barra magnética, o phmetro (digimed – DM22) e o medidor de temperatura (digimed – DM 22) foram colocados no becker, acrescentando ácido clorídrico com a pipeta de Pasteur de plástico até atingir o ph 7,5 na temperatura de 25° C. A solução foi levada ao balão volumétrico e acrescentou água Mili-Q até chegar ao menisco.

Para a realização das análises das amostras, foi necessária a preparação do tampão Tris-HCl acrescentado de Zinco, para isso, pesou-se $8,07 \times 10^{-4}$ de Sulfato de Zinco (Merck) na balança analítica, e acrescentou-o a solução de 100 ml do Tris-HCl, que havia sido separada por uma proveta, em seguida agitou-se levando no agitador magnético com barra magnética. Com o auxílio de uma micropipeta coletou-se 0,05 microlitros de polietilenoglicol (Sigma Aldrich) e acrescentou-se ao tampão agitando lentamente para não formar bolhas (NETZEL-ARNETT et al., 1991).

4.7 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.

O método baseia-se na adição de etanol, ácido fosfórico e um corante chamado Azul Brillhante de Coomassie G-250 à solução contendo proteínas. No pH de reação, a interação

entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA et al., 1998).

A técnica consistiu na utilização de 10 µl da solução, e o teste é feito em uma placa ELISA, também conhecida como placa com 96 cavidades ou poços, dos quais 36 foram ocupados com amostras e 11 poços ocupados com os reagentes para calibração, denominados curva (BRADFORD, 1976)

Os leitores da placa ELISA, ou micro leitores de placas, fazem a espectrofotometria. Eles emitem luz em um comprimento de onda específico e medem a quantidade de luz absorvida e refletida por um objeto, no caso as proteínas presentes nas amostras. O corante apresenta comprimento de onda quando exposto à luz. A quantidade de reflexão, absorção e a cor identificada, medem a quantidade de proteína.

Utilizando um espectrofotômetro um programa de computador, obtivemos a curva analítica com os dados fornecidos, bem como a equação da curva e o coeficiente de correlação.

4.8 ANÁLISE DE MMP-8 NO TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL

O tecido gengival coletado através da excisão cirúrgica utilizando lâmina de bisturi nº 15 de aço carbono, descartável (EMBRAMAC®) na região do 1º molar inferior esquerdo e armazenado em frasco contendo 2 ml do tampão Tris-HCl. Este tecido foi homogeneizado utilizando o aparelho de ultrassom Ultra 80 (Ultra Stirrer). Em seguida coletou-se 360 µl do homogenato, 360 µl da solução tampão Tris-HCl (pH 7,5) a 4°C com 50 mM do Sulfato de Zinco (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e 0,05% de polietilenoglicol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) acrescentando na cubeta de quartzo. Após levou-se o mesmo ao fluorímetro (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) e acrescentou-se 80 µl do Substrate MMP-8, 200 µm (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) (NETZEL-ARNETT et al., 1991).

As configurações utilizadas para análise no fluorímetro (Varian, Mulgrave, Victoria, Austrália) para análise foram de 280 nm de excitação e 360 nm de emissão. A cinética enzimática foi avaliada com base na velocidade máxima, no período de tempo de 0 a 45 minutos. A determinação da MMP-8 foi realizada em quintuplicata e a média destes valores foi realizada para todos os cálculos subsequentes.

4.9 TOMADA RADIOGRÁFICA E ANÁLISE DIGITAL

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas. Em seguida os lados direito e esquerdo das peças foram divididas e o esquerdo radiografado.

Sobre uma mesa, as hemimandíbulas esquerdas foram posicionadas com as superfícies vestibulares voltadas para a película radiográfica (Dental Intraoral E-Speed Film - Carestream).

A padronização das tomadas radiográficas foi obtida da seguinte forma:

“Uso de um aparelho de raios X Pampas - E (General Eletric, Milwaukee, EUA), com os seguintes fatores, 65 kvp, 10 mA;

“Feixe central de raios-X incidindo perpendicular ao plano do filme-objeto, em um ângulo de 90° com a superfície do filme;

“Distância focal de 30 cm;

“Tempo de exposição 0,8 segundos;

As radiografias foram processadas utilizando-se soluções reveladora e fixadora, pronta para uso Carestream, pelo método de processamento tempo-temperatura.

As radiografias foram escaneadas e as imagens foram analisadas no programa Imagelab (Softium, Brasil) com o uso da ferramenta distância e ângulo de mensuração. Com este recurso, mediu-se 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). O mouse era posicionado na região correspondente a união cimento-esmalte. O botão esquerdo era acionado e arrastado até ao nível da crista óssea alveolar e o programa mensurava a distância automaticamente.

4.10 PROCESSAMENTO LABORATORIAL E ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Os espécimes foram desmineralizados em solução de ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20% e após esta etapa incluídos em parafina. Os cortes foram realizados de forma semi-seriados no sentido méso-distal, com 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Para análise do nível ósseo interradicular foi utilizado um aumento de 5X. A área expressa em mm² de perda óssea (PO) na região de furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagem (Imagelab 2000 - Software Diracon Bio Informática LTDA - Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Após exclusão, da primeira e da última secção na qual a região de furca foi evidente, cinco secções eqüidistantes de cada dente foram selecionadas para análise histométrica (CÉSAR-NETO et al., 2006). A PO foi avaliada medindo a extensão da área entre a crista óssea e a superfície do cimento do teto da furca.

A seleção das secções histológicas foi realizada por um examinador treinado e cego ao tratamento realizado. Outro examinador cego ao tratamento e calibrado, realizou a análise histométrica. A PO de cada espécime foi avaliada três vezes pelo mesmo examinador e em dias diferentes (FERNANDES et al., 2009). As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Os valores médios foram averiguados e comparados estatisticamente.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados bioquímicos, radiográficos e histomorfométricos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 3.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil). A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa dos dados entre os diferentes grupos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada. Após análise da normalidade dos valores pelo teste Shapiro-Wilk, a análise intra e intergrupos foram realizadas pela análise de variância a dois critérios ANOVA com complementação de Bonferroni ($p < 0,01$).

5 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados das análises bioquímica, radiográfica e histométrica.

5.1 ANÁLISE DE MMP-8 NO TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL (TABELA 1)

Os animais do grupo C (131.07 ± 2.64 un; 115.37 ± 0.11 un; 102 ± 1.50 un) apresentaram uma expressão de MMP-8 significativamente maior ($p < 0,01$) comparado aos do grupo S (67.14 ± 1.05 un; 52.84 ± 2.82 un; 46.62 ± 3.25 un) em todos os períodos experimentais. Na expressão de MMP-8 intra grupos, os animais de ambos os grupos apresentaram uma expressão significativamente maior ($p < 0,01$) aos 7 dias comparado aos 30 dias.

Tabela 1- Médias e desvios padrões (M \pm DP) da expressão em unidades de MMP-8 no tecido conjuntivo gengival dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período.

Períodos Grupos	7 dias	15 dias	30 dias
C	$131.07 \pm 2.64^{*+}$	$115.37 \pm 0.11^*$	$102 \pm 1.50^{*+o}$
S	$67.14 \pm 1.05^{*+}$	$52.84 \pm 2.82^*$	$46.62 \pm 3.25^{*+}$
Total	12	12	12

Fonte: Da autora

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

+Diferença entre os períodos, mesmos grupos (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0,01$).

5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA (TABELA 2 e FIGURAS 10 a 15)

Na análise radiográfica entre grupos, os animais do grupo C ($2.65\pm 0.11\text{mm}$; $1.82\pm 0.01\text{mm}$; $1.53\pm 0.34\text{mm}$) apresentaram uma perda óssea (PO) significativamente maior ($p<0,01$) comparado ao grupo S aos 7, 15 e 30 dias respectivamente ($0.71\pm 0.42\text{mm}$; $0.64\pm 1.03\text{mm}$; $0.59\pm 2.23\text{mm}$). Na análise radiográfica intra grupos, os animais do grupo C apresentaram uma perda óssea (PO) significativamente maior ($p<0,01$) aos 7 dias comparado aos 30 dias respectivamente ($2.65\pm 0.11\text{mm}$; 1.82 ± 0.01 ; $1.53\pm 0.34\text{mm}$).

Tabela 2- 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 e período.

Períodos Grupos	7 dias	15 dias	30 dias
C	$2.65\pm 0.11^{*+}$	$1.82\pm 0.01^*$	$1.53\pm 0.34^{*+}$
S	$0.71\pm 0.42^*$	$0.64\pm 1.03^*$	$0.59\pm 2.23^*$
Total	12	12	12

Fonte: Da autora.

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

+Diferença entre os períodos, mesmos grupos (ANOVA e Bonferroni, com $p<0,01$).

FIGURA 10- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 7 dias.



Fonte: Da autora.

FIGURA 11- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 15 dias.



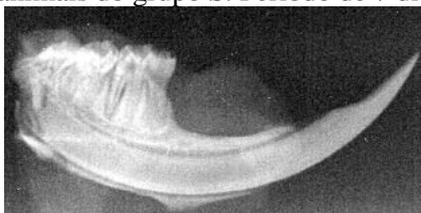
Fonte: Da autora.

FIGURA 12- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo C. Período de 30 dias.



Fonte: Da autora

FIGURA 13- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 7 dias.



Fonte: Da autora.

FIGURA 14- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 15 dias.



Fonte: Da autora.

FIGURA 15- Imagem radiográfica da hemimandíbula esquerda dos animais do grupo S. Período de 30 dias.



Fonte:Da autora.

5.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA (TABELA 3 e FIGURAS de 16 a 21)

Na análise histométrica entre grupos, os animais do grupo C ($1.12 \pm 0.11 \text{mm}^2$; $1.01 \pm 0.29 \text{mm}^2$; $0.95 \pm 0.34 \text{mm}^2$) apresentaram uma perda óssea (PO) significativamente maior ($p < 0,01$) comparado ao grupo S ($0.72 \pm 0.12 \text{mm}^2$; $0.67 \pm 0.22 \text{mm}^2$; $0.60 \pm 1.83 \text{mm}^2$) aos 7, 15 e 30 dias respectivamente.

Tabela 3- Médias e desvios padrões (M±DP) dos dados histométricos da PO (mm²) na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo e período.

Períodos Grupos	7 dias	15 dias	30 dias
C	1.12±0.11*	1.01±0.29*	0.95±0.34*
S	0.72±0.12*	0.67±0.22*	0.60±1.83*
Total	12	12	12

Fonte: Da autora.

*Diferença entre os grupos, mesmo período (ANOVA e Bonferroni, com $p < 0.01$).

FIGURA 16- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 7 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora

FIGURA 17- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros

molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 15 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora.

FIGURA 18- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo C aos 30 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora.

FIGURA 19- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 7 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora

FIGURA 20- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 15 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora.

FIGURA 21- Fotomicrografia ilustrando as áreas de PO na região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos com doença periodontal induzida do Grupo S aos 30 dias. Aumento original 5X com coloração em H.E.



Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

A remoção mecânica do biofilme dentário através da RAR é a base do tratamento periodontal, porém pode ser falho em alguns sítios dentários (ADRIAENS et al., 1988; MATIA et al., 1986). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos locais da estatina como coadjuvante ao tratamento de RAR da doença periodontal induzida em ratos.

A escolha do rato, como modelo animal experimental baseou-se nos estudos de Klausen (1991), Segundo o autor, o rato é favorável como modelo experimental para o desenvolvimento e estudo da doença periodontal pela semelhança do seu periodonto com o do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular.

Em relação ao modelo de indução da doença periodontal utilizado no presente estudo foi o proposto por Johnson (1975), que utilizou a colocação de um fio de algodão ao redor dos molares de ratos. O autor salientou que a ligadura favorece o acúmulo bacteriano, desenvolvendo dessa forma a doença periodontal. No presente estudo este modelo também mostrou-se eficiente na indução da doença periodontal experimental, pois a ligadura induziu a formação de placa bacteriana e uma resposta inflamatória local. A doença periodontal foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival, como edema, vermelhidão e perda da aderência do tecido gengival ao dente.

Durante a doença periodontal, um desequilíbrio entre as metaloproteinases de matriz (MMPs) ativadas e seus inibidores endógenos derivados do hospedeiro, os inibidores de metaloproteinase de matriz (TIMP), leva ao colapso patológico da matriz extracelular (SORSA et al., 2016). As MMPs desempenham um importante papel na remodelação do tecido conjuntivo durante o desenvolvimento, homeostase e cicatrização (SORSA et al., 2016). Entre outras atividades, as MMPs degradam as fibras colágenas inseridas na raiz dentária, permitindo a migração apical e a extensão lateral do epitélio da bolsa. A seqüela clínica do aumento patológico da destruição do colágeno é a perda de inserção, perda óssea e formação da bolsa periodontal (AKIBARI et al., 2015).

A MMP-8 tem despertado interesse por ser encontrada em várias doenças inflamatórias como periodontite, bronquite, asma e artrite. Recentemente, tem sido demonstrado exercer uma inesperada atividade anti-inflamatória defensiva e protetora contra o espalhamento de câncer de pele experimental e doença inflamatória pulmonar, provavelmente por processar citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas bem como regular a apoptose de células inflamatórias e a resposta imune (GUEDERS et al., 2005).

Juntamente com MMP-9 derivada de neutrófilo e MMP-13 derivada de células ósseas ou epiteliais, a MMP-8 destaca-se entre as MMPs predominantemente presentes no tecido gengival inflamado, FGC, saliva e fluido sulcular e periimplantar. O nível e grau de ativação destas enzimas parecem aumentar com o aumento da atividade e gravidade da doença periodontal e diminuir em seguida ao tratamento com raspagem e alisamento radicular (RAR) (KURGAN et al., 2015).

Estudo recente demonstrou que os níveis de MMP-8 em portadores de periodontite crônica, fumantes e não fumantes, reduziram significativamente após terapia periodontal de RAR (AKIBARI et al., 2015). Este fato foi demonstrado em nosso estudo, pois na expressão de MMP-8 intra grupos, os animais de ambos os grupos apresentaram uma expressão significativamente maior aos 7 dias comparado aos 30 dias pós tratamentos locais.

Podemos observar também que os animais do grupo C apresentaram uma expressão de MMP-8 significativamente maior comparado aos do grupo S em todos os períodos experimentais, provavelmente pela ação antiinflamatória da Sinvastatina. Bradley et al. (2016), reforçam esta hipótese, pois demonstraram que aplicações tópicas de Sinvastatina foram capazes de diminuir o processo inflamatório na periodontite experimental em ratos. Luan et al. (2003), observaram que as estatinas diminuem a produção de muitas citocinas pró-inflamatórias e, também tem sido descrito que favorecem a diminuição da secreção de outras metaloproteinasas de matriz *in vitro*. Dessa forma, estas poderiam reduzir a resposta inflamatória, protegendo contra a destruição do tecido periodontal.

Estatinas são drogas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase, conduzindo à gestão da produção do colesterol (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 (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.

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 citada anteriormente.

Nas análises radiográfica e histométrica entre grupos, os animais do grupo C apresentaram uma PO significativamente maior comparado ao grupo S aos 7, 15 e 30 dias respectivamente. Estudos na literatura também têm demonstrado efeitos benéficos do uso de estatinas na prevenção da perda óssea alveolar em periodontites experimentais em ratos (BRADLEY et al., 2016; XU; NASSAR et al., 2014). Um dos fatores que poderiam explicar estes resultados seria que as estatinas inibem a transformação de pré-osteoclastos em osteoclastos através das células da medula óssea e pela ação indireta via osteoblastos. Os osteoblastos recrutam e ativam os osteoclastos através da interação do RANKL na sua superfície, com o receptor RANK nas células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos. Essa ativação dos osteoclastos é controlada pelos osteoblastos pela secreção de OPG, um receptor solúvel que compete com RANKL pelo RANK para inibir o recrutamento dos osteoclastos, mantendo um equilíbrio entre ambos (NOBRE et al., 2012).

A ação das estatinas também decorre da inibição da apoptose dos osteoblastos pela ação do fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1). O TGF- β 1 apresenta papel fundamental na formação óssea, sendo as proteínas SMAD (Proteínas moderadoras do fator do crescimento transformante) pertencentes a essa via de sinalização (ZHANG et al., 2014). Existem evidências de inibição da apoptose osteoblástica regulada por Pitavastatina, Mevastatina e Sinvastatina, devido à maior expressão de SMAD3 (Proteínas moderadoras do fator do crescimento transformante 3), que funciona como transdutora de sinal e moduladora da transcrição (PACHECO-PANTOJA et al., 2014). A SMAD3 ativa é fundamental para a manutenção da formação óssea, enquanto que sua supressão acarreta a apoptose osteoblástica (ZHANG et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a estatina aplicada localmente foi efetiva como tratamento coadjuvante à RAR na doença periodontal induzida em ratos.

REFERÊNCIAS

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.

AHN, J. J. et al. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 1, p. 83-90, 2011.

AKBARI, G. et al. Analysis of matrix metalloproteinase-8 levels in gingival crevicular fluid and whole mouth fluid among smokers and nonsmokers using enzyme-linked immune-sorbent assay and a novel chair-side test. **J Indian Soc Periodontol**, v. 19, n. 5, p. 525-30, 2015.

ALAM, S. et al. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immune histo chemical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 1, p. 22-9, 2009.

ARMITAGE, G. C. et al. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. **J of Periodontolog**, v. 71, n. 2, p. 164-171, 2000.

AYUKAWA, Y. et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 3, p. 336-42, 2009.

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, p. 438-44, 2005.

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.

BERGSTROM, J. Smoking rate and periodontal disease prevalence: 40-year trends in Sweden 1970-2010. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 10, p. 952-7, 2014.

BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 36-47, 2011.

BEZERRA, I. M. et al. Evaluation of knowledge about therapy full mouth disinfection by periodontists of the city João Pessoa-PB. **Braz J Periodontol**, v. 25, n. 1, p. 14-20, 2015.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOSTAN, B. et al. Simvastatin improves spinal fusion in rats. **Acta OrthopTraumatol Turc**, v. 45, n. 4, p. 270-75, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, J. D. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin- induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation in vivo. **J Periodontol Research**, v. 42, n. 3, p. 267-73, 2007.

BRADLEY, A. D. et al. Effect of Simvastatin Prodrug on Experimental Periodontitis. **J Periodontol**, v. 22, p. 1-13, 2016.

BULMANSKI, Z. et al. Cigarette Smoke Extract Induces Select Matrix Metalloproteinases and Integrin Expression in Periodontal Ligament Fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 6, p. 787-796, 2012.

CARRARO, E. A. S. et al. Procedimentos básicos em Periodontia. **Rev. dental press periodontia implantol**, v. 2, n. 2, p. 41-53, 2008.

CÉSAR-NETO, J. B. et al. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 2, p. 118-123, 2006.

CHEN, M. S. et al. Effects of simvastatin gel on bone regeneration in alveolar defects in miniature pigs. **Chinese Medical Journal**, v. 124, n. 23, p. 3953-58, 2011.

CHISSAS, D. et al. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. **Injury**, v. 41, n. 7, p. 687-92, 2010.

CHOU, J. et al. Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic β -TCP Drug Delivery System. **PloS One**, v. 8, n. 1 p. 546-76, 2013.

CHUENG SAMAN, S. et al. Effects of statins vs. non-statin lipid-lowering therapy on bone formation and bone mineral density biomarkers in patients with hyperlipidemia. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1011-5, 2010.

COSYN, J. SABZEVAR, M. M. A systematic review on the effects of subgingival chlorhexidine gel administration in the treatment of chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 1805-1813, 2005.

CUNHA-CRUZ, J. et al. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. **J Periodontol**, v. 77, p. 1061-6, 2006.

DALCICO R. et al. Protective Mechanisms of Simvastatin in Experimental Periodontal Disease. **J of Periodontol**, v.84, n.8, p. 1145-1157, 2013.

DICKIE DE CASTILHOS, E. et al. Association between obesity and periodontal disease in young adults: a population-based birth cohort. **J of clin periodontol**, v. 39, n. 8, p. 717-724, 2012.

ELAVARASU, S.; SUTHANTHIRAN, T. K.; NAVEEN D. Statins: A new era in local drug delivery. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 4, n. 2, p. 248-51, 2012.

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

FUKUI, T. et al. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 5, p. 1118-31, 2012.

GARIP, S. et al. Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3233-41, 2010.

GENCO, R. J. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 62, p. 59-94, 2013.

GHOSH-CHOUDHURY, N. et al. Statin-induced Ras activation integrates the phosphatidylinositol 3-kinase signal to Akt and MAPK for bone morphogenetic protein-2

expression in osteoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 4983-4993, 2007.

GMUR, R.; GUGGENHEIM, B. Interdental supragingival plaque-a natural habitat of *Actinobacillusactinomycetemcomitans*, *Bacteriodesforsythus*, *Campylobacter restus* and *Prevotellanigrescens*. **J Dent Res**, v. 73, n. 8, p. 1421-8, 1994.

GUEDERS, M. M. et al. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. **J Immunol**, v. 175, n. 4, p. 2589-97, 2005.

HAIJSHENGALLIS, G. et al. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. **Cell Host & Microbe**, v. 10, p. 497-506, 2011.

HEASMAN, P. A. et al. Cost-effectiveness of adjunctive antimicrobials in the treatment of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 217-230, 2011.

HOFFMAN, W. F. et al. 3- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 849-52, 1986.

HUGHES, A. et al. A comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomyinduced bone loss in vivo. **Calcif Tissue Int**, v. 81, n. 5, p. 403-13, 2007.

HWANG, R.; et al. Calcyclin, a Ca^{2+} ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21239-47, 2004.

IGIC, M. et al. Chronic gingivitis: the prevalence of periodontopathogens and therapy efficiency. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 1911-1915, 2012.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufhath administration on the periodontium of the rat. **J Periodontal Res**, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

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.

KIILI, M. et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. **Journal of Clin Periodontol**, v. 29, p. 224-232, 2002.

KIM, I. S. et al. Lactone form 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) stimulate the osteoblastic differentiation of mouse periodontal ligament cells via the ERK pathway. **Journal of Periodontol Research**, v. 46, p. 204-213, 2011.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J of Clin Periodontol**, v. 38, p. 44-48, 2011.

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.

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.

KUMAR, M. S. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and MMP-9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. **J Periodontol**, v. 77, n. 11, p. 1803-8, 2006.

KURGAN, S. et al. The effects of periodontal therapy on gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8, interleukin-6 and prostaglandin E2 levels in patients with rheumatoid arthritis. **J Periodontol Res**. 2015 Nov 17. doi: 10.1111/jre.12337. [Epub ahead of print]

LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, p. 165-176, 1998.

LAIN, L. et al. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **J of clin periodontology**, v. 40, n. 14, p. 106-112, 2013.

LAUER-FIELDS, J. L.; JUSKA, D.; FIELDS, G. B. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 19-32, 2002.

LEE, J. H. et al. Lack of neuroprotective effects of simvastatin and minocycline in a model of cervical spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 225, n. 1, p. 219-30, 2010.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**, 5. ed. Guanabara Koogan, 2010.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

LIU, C.; WU, Z.; SUN, H. Effect of Simvastatin on mRNA Expression of Transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Tooth Extraction Socket. **Int J Oral Sci**, v. 1, n. 2, p. 90-8, 2009.

LIU, S. et al. Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells. **Hum Cell**, v. 25, n. 2, p. 29-35, 2012.

LIU, B. et al. Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37919, 2012.

LLINGWORTH, D. R; TOBERT, J. A. HMG-CoA reductase inhibitors. **Advances in Protein Chemistry**, v. 56, p. 77-114, 2001.

LOCKHART, P. B. et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 125, n. 20, p. 2520-2544, 2012.

LOOMER, P. M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. **Periodontol**, v. 34, p. 49-56, 2004.

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. **ArteriosclerThrombVascBiol**, v. 23, n. 5, p. 769-775, 2003.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681-92, 2003.

MAEDA, T. et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 280, p. 874-77, 2004.

MATESANZ-PÉREZ, P. et al. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.40, p. 227–241, 2013.

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.

MATTHEWS, D. C. No difference between full-mouth and quadrant-wise treatment of chronic periodontitis. **Evid Based Dent**, v. 10, n. 1, p. 17, 2009.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v. 286, p. 1946-1949, 1999.

NASSAR, P. O. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, p. 479-488, 2009.

NASSAR, C. A. et al. Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis--an animal study. **J Int Acad. Periodontol**, v. 16, n. 1, p. 2-7, 2014.

NATH, S. G.; RAVEENDRAN, R. “What is there in a name?”: A literature review on chronic and aggressive periodontitis. **J Indian Soc Periodontol**, v. 15, n. 4, p. 318– 322, 2011.

NETZEL-ARNETT, N. et al. Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. **Anal. Biochem**, v. 195, p. 86, 1991.

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.

NOBRE, D. et al. Patogênese da osteonecrose dos ossos maxilares induzida por bifosfonatos: o que se sabe atualmente? **Rev Bras Med**, v. 69, p. 318-22, 2012.

NYAN, M. et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 93, n. 1, p. 65-73, 2010.

NYAN, M. et al. Accelerated and Enhanced Bone Formation on Novel Simvastatin-Loaded Porous Titanium Oxide Surfaces. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 16, n. 5, p. 675-83, 2014.

OKA, S. et al. Local Administration of Low- Dose Simvastatin-Conjugated Gelatin Hydrogel for Tendon–Bone Healing in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 9-10, p. 1233-43, 2013.

OTUKI, M. F.; PIETROVSKI, E. V.; CABRINI, D. A. Topical simvastatin: Preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v. 44, p. 45-47, 2006.

PACHECO-PANTOJA, E. L.; ALVAREZ-NEMEGYEI, J. Estatinas y osteoporosis. **Reumatol Clin**, v. 10, p. 201-3, 2014.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration whit chronic disease prevention and control. **Periodontol 2000**, v. 60, n. 1, p. 15-39, 2012.

PRADEEP, A. R.; THORAT, M. S. Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. **J Periodontol**, v. 81, n. 2, p. 214-22, 2010.

PRADEEP, A. R. et al. Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2-mg simvastatin in the treatment of individuals with class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 83, n. 12, p. 1472-9, 2012.

PRETZL, B.; WIEDEMANN, D.; COSGAREA, R. Effort and costs of tooth preservation in supportive periodontal treatment in a German population. **J. of Clin. Periodontol**, v. 36, p.669-676, 2009.

QUERIDO, S. M. R.; CORTELLI, J. R. Antimicrobianos locais como adjuntos a terapia periodontal. **Rev. Biociência**, v. 2, n. 9, p. 01-08, 2003.

REGEZI, J. A; SCIUBBA, J. J. Patologia bucal: correlações clinicopatológicas. 6a ed. Rio de Janeiro: Ed. **Elsevier**, p. 374-86, 2013.

RUAN, F; ZHENG, Q; WANG, J. Mechanisms of bone anabolism regulated by statins. **Bioscience Reports**, v. 32, p. 511-519, 2012.

RYAN, M. E.; GOLUB, L. M. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 226-238, 2000.

SALVI, G. E. et al. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. **J. of Clin. Periodontol**, v. 29, p. 540-550, 2002.

SANTANA, J. F. Q. et al. Comparative evaluation between conventional periodontal treatment and full mouth disinfection. **Braz J Periodontol**. v. 24, n. 1, p. 41-47, 2014.

SAVER, B. G. et al. Are statins associated with decreased tooth loss in chronic periodontitis? **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, p. 214-219, 2007.

SÉEGUIER, S; GODEAU, G; BROUSSE, N. cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. **J Periodontol**, v. 71, n. 7, p. 1079-85, 2000.

SETO, H. et al. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. **J of Periodontal Res**, v. 43, n. 3, p. 261-7, 2008.

SONDERGAARD, T. E. et al. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. **Hematol Oncol**, v. 27, p. 17-22, 2009.

SORSA, T. et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 30, n. 878, p. 130-40, 1999.

SORSA, T. et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 70, n. 1, p. 142-63, 2016.

SOUZA, D. G. et al. Análise do grau de conhecimento em relação aos instrumentais utilizados na disciplina de periodontia dos alunos do último período de faculdades de odontologia do Rio de Janeiro. **Braz J Periodontol**, v. 22, n. 1, p. 94-99, 2012.

STEIN, S. H. et al. Statins regulate interleukin-1 β -induced RANKL and osteoprotegerin production by human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, p. 483-490, 2011.

THOMSON, W. M.; SHEIHAM, A.; SPENCER, A. J. Sociobehavioral aspects of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 54-63, 2012.

THONE-MUHLING, M. et al. Comparison of two full-mouth approaches in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot study. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 5, p. 504-12, 2010.

TING, M.; WHITAKER, E.J.; ALBANDAR, J.M. Systematic review of the in vitro effects of statins on oral and perioral microorganisms. **Eur J Oral Sci**, v. 124, p. 4-10, 2016.

VAZIRI, H. al. Effects of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **J Periodontol**, v. 78, p. 1561-7, 2007.

WALKER, C.; KARPINIA, K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. **J Periodontol**, v. 23, p. 707-716, 2002.

WEIJDEN, F.V.D.; SLOT D. E. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. **Periodontology 2000**, v. 55, p. 104-123, 2011.

WIEBE, C. B.; PUTNINS, E. E. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology- an update. **J. Can. Dent. Assoc**, v. 66, p. 594- 597, 2000.

WORCH, K. P.; LISTGARTEN, M. A.; KOROSTOFF, J. M. A multidisciplinary approach to the diagnosis and treatment of early-onset periodontitis: a case report. **J Periodontol**, v. 72, p. 96-106, 2001.

XU, X. C. et al. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. **J Transl Med**, v. 1, n. 12, p. 284, 2014.

YAMASHITA, M. et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. **J Endocrinol**, v. 196, p. 601, 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, H.; LIN, C. Y. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 15, n. 33, p. 525-31, 2008.

ZHANG, Y. et al. Statins, bone metabolism and treatment of bone catabolic diseases. **Pharmacol Res**, v. 88, p. 53-61, 2014.

ZHOU, Y. et al. The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose derived stromal cells and platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 31, n. 20, p. 5325-35, 2010.

ANEXO

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, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 605/2014, sob responsabilidade de Leandro Araújo Fernandes, referente ao projeto "Efeitos da estatina como coadjuvante ao tratamento convencional da doença periodontal induzida em ratos" está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIFAL).

Alfenas, 12 de fevereiro de 2015.

Estela Regina de Oliveira
Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL