UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

Diego Moura Soares

EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFILA NA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS

Recife-PE

2017

Diego Moura Soares

EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFILA NA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez

Recife-PE

2017

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S676e Soares, Diego Moura.
Efeito do citrato de sildenafila na progressão da doença periodontal experimental em ratos / Diego Moura Soares. – 2017.
65 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Citrato de sildenafila. 2. Doença periodontal.. 3. Periodontite. I. Perez, Danyel Elias da Cruz (Orientador). II. Titulo.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-172)

DIEGO MOURA SOARES

Aprovado em 16 de fevereiro de 2017

EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFILA NA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM RATOS

Orientador: Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Banca Examinadora:

5º _____
Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

4º _____
Profa. Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

3º _____
Profa. Dra. DANIELA DA SILVA FEITOSA (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

2º _____
Prof. Dr. RENATO DE VASCONCELOS ALVES (Examinador externo)
Universidade de Pernambuco – FOP/UPE

1º _____
Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO GALVÃO BARBOZA (Examinador externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR
Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR
Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR
Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
Profª. Drª. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

COLEGIADO
Profª. Drª. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho
Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes
Profª. Drª. Andrea Cruz Camara
Profª. Drª. Andrea dos Anjos Pontual
Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior
Profª. Drª. Bruna de Carvalho Farias Vajgel
Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar
Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez
Profª. Drª. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez
Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy
Prof. Dr. Jair Carneiro Leão
Profª. Drª. Jurema Freire Lisboa de Castro
Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros
Profª. Drª. Maria Luiza dos Anjos Pontual
Profª. Drª. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA
Oziclere Sena de Araújo

Dedico esta obra...

À Deus,

Por sempre se fazer presente em minha vida

me fazendo forte e perseverante para superar os obstáculos.

Aos meus pais,

Marinalv e Lourinaldo.

Dedico a você pelo apoio e o amor incondicional de sempre.

Amo cecês!!

AGRADECIMENTOS

À DEUS*, por me permitir concluir este curso, me fazendo enxergar muito além daquilo que se postava em minha frente. Por me dar forças nas horas certas e de desânimo, pela saúde, pelos amigos e por, através dos obstáculos, mostrar-me a força, o potencial e a fé existentes em mim.*

Aos meus pais, ***Lourinaldo Moura Soares*** *e* ***Marinalva Fiel Soares****, por sempre contribuírem e apoiarem as minhas decisões e sonhos, mesmo que para isso fosse necessário abdicar dos seus. Obrigado por transformarem minhas angústias, agitações e tristezas, em segurança e força. Obrigado por se fazerem presentes em cada minuto por todos esses anos. Vocês são e fazem parte do que eu sou. Meus sinceros e eternos agradecimentos.*

À minha irmã, ***Danúbia Moura****, pela amizade, apoio e incentivo durante toda esta jornada.*

Ao meu orientador, ***Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez****, meu sincero agradecimento pela confiança depositada em mim desde o primeiro momento. Obrigado por ser um exemplo de competência, humildade e simplicidade a ser seguido.*

À ***Universidade Federal de Pernambuco****, em especial ao* ***Departamento de Prótese e Cirurgia Buco Facial*** *e ao* ***Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva*** *por ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho.*

Aos professores ***Andrea Pontual, Daniela Feitosa e Gustavo Godoy****. Obrigado pelas contribuições feitas durante a realização da pré-banca de doutorado, todas as colocações foram de extrema importância para a melhoria deste trabalho.*

Ao Professor e amigo, ***Dr. Uoston Holder da Silva*** *(in memória), agradeço pela força e incentivo dado para o começo de uma carreira acadêmica. Você foi e continuará sempre sendo um grande exemplo para minha vida profissional. Obrigado por acreditar em mim.*

Ao Professor e amigo, ***Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza****, obrigado por todo aprendizado e incentivo dado. A semente plantada do questionamento e indagações necessária em todo pesquisador permanecerá viva sempre.*

*À amiga **Priscylla Correia**, que com o passar do tempo se tornou uma irmã. Você é um exemplo de esforço, dedicação e humildade. Sua valiosa ajuda e dedicação foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Sentirei saudades de todos os nossos momentos vividos, porém me conforto na certeza de que o nosso laço permanecerá por toda a vida!*

*Ao aluno de iniciação científica, **Samuel Araújo**, pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos e a disponibilidade sempre que necessária. Nossa convivência nos tornou muito mais do que apenas companheiros de grupo de pesquisa, hoje somos amigos para toda vida.*

***A todos os colegas de turma do curso de doutorado** por compartilharem suas experiências, tornando o nosso dia a dia mais leve. Obrigado pelo companheirismo e a ajuda mútua durante todo esse tempo.*

*À amiga de turma, **Ana Carolina Lima**. Carolzinha, te agradeço por ser um porto seguro sempre disponível a nos ajudar. Conviver com você foi sem dúvida um grande presente.*

*Ao técnico do laboratório de Patologia Oral da UFPE, **Sr Rogério**, meus agradecimentos pelo companheirismo e disponibilidade.*

*Aos técnicos do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, **Veridiana e Rodrigo**, obrigado pelo auxílio durante o período experimental desse projeto*

Ao **Departamento de Energia Nuclear**, por ceder a extrutura necessária para realização de toda a análise microtomográfica deste estudo

*Aos amigos potiguares, **Fernanda Ginani e Paulo Costa**, que mesmo distante continuam sendo exemplos de amizade. Obrigado pelo apoio e amizade de sempre.*

*À **Oziclere Sena**, secretária do programa de pós-graduação em Odontologia da UFPE. Agradeço por ser solícita, amiga e prestativa sempre que preciso.*

*À amiga **Elaine Tavares**, obrigado pela confiança e por me auxiliar na reinserção no mercado de trabalho. Seu apoio foi fundamental para a minha manutenção nos meus primeiros momentos aqui nesta cidade.*

*Aos amigos que a odontologia me deu, **Gabriela Marques**, **Mayara Russana** e **Nathália Vilar**, obrigado por fazer parte do início dessa minha jornada, por me incentivarem desde o início, pela confiança, amizade sempre depositada e pelos inúmeros momentos de descontração.É muito bom poder compartilhar dessa incrível profissão que escolhemos com todos vocês!*

*À querida amiga **Renata Costa**, por gentilmente abrir as portas da sua casa e me abrigar durante os primeiros meses. Nunca esquecerei dessa imensa prova de amizade. Meu muito obrigado!*

*Ao querido **Rodrigo Cunha**, que tive o prazer de dividir momentos da minha vida. Obrigado por todos os momentos vividos, pelas alegrias compartilhadas, por ser essa pessoa tão especial e por entender os meus momentos de ausência.*

*Àqueles **amigos que a vida me deu**, que nem o tempo, nem a distância pode separar ou se quer enfraquecer o que sentimos. **Natália Pimentel**, minha fortaleza que sempre esteve disposta a me aconselhar, te amo Nana. **Juliana Pimentel**, obrigado por ser dura quando necessário e ao mesmo tempo amável me fazendo ver aquilo que não consegui enxergar. **Everson Lima**, o irmão que eu não tive, obrigado pelo companheirismo e amizade de sempre. Obrigado amigos por entenderem minha ausência e se fazerem presentes, mesmo que distantes, me dando força para continuar.*

*À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco** (FACEPE) pelo suporte financeiro na forma de bolsa de mestrado.*

À toda minha família e amigos, pelo estímulo no sucesso deste trabalho e pela compreensão em todos os momentos de ausência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento!

"É preciso força,

pra sonhar e perceber

que a estrada vai além do que se vê".

(Marcelo Camelo)

RESUMO

O citrato de sildenafila é um potente inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 e a sua descoberta representou um grande avanço no tratamento da disfunção erétil. Atualmente, este fármaco vem mostrando efeitos positivos no que diz respeito à diminuição do processo inflamatório e redução do estresse oxidativo, com conseqüente redução do dano tecidual, em diversas patologias. Como o processo inflamatório é um fator primordial na destruição dos tecidos periodontais decorrente da periodontite, objetivou-se avaliar o efeito do citrato de sildenafila na prevenção e progressão da periodontite experimental (PE) em ratos. Este estudo foi dividido em dois grupos. Grupo 1 (n=18), a droga foi administrada previamente e apenas 15 dias depois a PE foi induzida, permanecendo mais 15 dias de administração diária da droga. No grupo 2 do estudo (n=18) a administração da droga e a indução da PE iniciaram no mesmo dia e se mantiveram por mais 15 dias. Nos dois grupos os animais foram divididos em três subgrupos (n=6). Subgrupo placebo, doses diárias de veículo e indução da PE. Subgrupo controle, doses diárias de 10mg/kg de sildenafila sem indução da PE. Subgrupo sildenafila, indução da PE e doses diárias de 10mg/kg de sildenafila. A PE foi induzida no primeiro molar inferior esquerdo, através de ligadura e decorrido o período experimental, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas removidas e analisadas através de microtomografia computadorizada (microCT), histologia e histomorfometria. Os dados foram tabulados e submetidos ao teste T para amostras independentes ou teste de Mann Whitney, de acordo com a distribuição das variáveis, considerando um intervalo de confiança de 95%. No grupo 1 do estudo, não observou-se diferenças significativas quando comparado o grupo que recebeu veículo associado a PE com o grupo tratado com droga, em nenhuma das análises realizadas. No grupo 2, a partir da análise por microCT verificou-se, diferença estatística na área de furca quando comparado o subgrupo controle com o subgrupo que recebeu doses diárias de sildenafila associado a PE, com um menor padrão de reabsorção óssea para o grupo sildenafila. Da mesma forma, o grau de inflamação mostrou diferença estatística quando comparou a área de furca dos subgrupos controle e sildenafila, com menores escores de inflamação para o grupo sildenafila, no grupo 2 do estudo. Além disso, observou-se formação de microabscessos e áreas de osso necrótico em todos os espécimes avaliados do subgrupo placebo no segundo grupo do estudo, este fato não foi verificado no subgrupo tratado com sildenafila. Na análise histomorfométrica houve uma tendência a menor reabsorção óssea para o subgrupo sildenafila quando comparado com o subgrupo placebo, no grupo 2 do estudo, porém sem significância estatística. Conclui-se que doses diárias de 10 mg/kg de citrato de sildenafila, diminuiu o processo inflamatório na região de furca, bem como a reabsorção óssea quando utilizado para fins de tratamento da periodontite experimental em ratos.

Palavras-chave: Citrato de sildenafila. Doença periodontal. Periodontite.

ABSTRACT

Sildenafil Citrate is a potent selective phosphodiesterase-5 inhibitor and its discovery represented a breakthrough in the treatment of erectile dysfunction. Currently, this drug has been showing positive effects with regard to the reduction of inflammatory process and reduction of oxidative stress, with consequent reduction of tissue damage, in several pathologies. The effect of sildenafil citrate on the prevention and progression of experimental periodontitis (PE) in rats was evaluated as the inflammatory process is a primary factor in the destruction of periodontal tissues due to periodontitis. This study was divided into two groups. Group 1 (n = 18), the drug was administered previously and only 15 days later PE was induced, remaining another 15 days of daily administration of the drug. In group 2 of the study (n = 18) the administration of the drug and the induction of PE started the same day and were maintained for another 15 days. In both groups, the animals were divided into three subgroups (n = 6). Placebo subgroup, daily vehicle doses and PE induction. Subgroup control, daily doses of 10mg / kg sildenafil without induction of PE. Subgroup sildenafil, induction of PE and daily doses of 10mg / kg of sildenafil. PE was induced in the lower left first molar by ligation and after the experimental period the animals were euthanized and the jaws removed and analyzed by computerized microtomography (microCT), histology and histomorphometry. The data were tabulated and submitted to the T test for independent samples or Mann Whitney test, according to the distribution of the variables, considering a 95% confidence interval. In group 1 of the study, no significant differences were observed when comparing the group that received vehicle associated to PE with the drug-treated group, in none of the analyzes performed. In group 2, a statistical difference was observed in the furcation area when the control subgroup was compared with the subgroup receiving daily doses of sildenafil associated with PE, with a lower bone resorption pattern for the sildenafil group. Likewise, the degree of inflammation showed statistical difference when comparing the furcation area of the control and sildenafil subgroups, with lower inflammation scores for the sildenafil group in group 2 of the study. In addition, formation of microabscesses and necrotic bone areas were observed in all assessed specimens of the placebo subgroup in the second study group, this fact was not found in the subgroup treated with sildenafil. In the histomorphometric analysis, there was a trend towards lower bone resorption for the sildenafil subgroup when compared to the placebo subgroup, in group 2 of the study, but without statistical significance. It is concluded that daily doses of 10 mg / kg sildenafil citrate decreased the inflammatory process in the furca region as well as bone resorption when used for the treatment of experimental periodontitis in rats.

Key-words: Sildenafil citrate. Periodontal disease. Periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental da primeira parte do estudo. A administração do sildenafila ocorreu do 1º até o 30º dia do estudo 30

Figura 2. Desenho experimental da segunda parte do estudo. A administração do sildenafila ocorreu a partir do 15º até o 30º dia do estudo ... 31

Figura 3. Imobilização do animal para administração da droga ou veículo através da técnica de gavagem 32

Figura 4. A- tomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST *microfocos* do Laboratório de Tomografia Computadorizada do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. **B-** espécime aprisionado a partir do incisivo central por uma pinça apropriada do Microtomógrafo sendo exposta aos feixes de raios x 33

Figura 5. Imagem microtomográfica da raiz mesial do primeiro molar inferior. **A-** Vista de um corte coronal da raiz mesial, previamente selecionada em um corte sagital. **B-** Linhas horizontais traçadas para delimitar a junção amelocementária e a crista óssea alveolar. A linha vertical medindo a distancia entre as referidas regiões anatômicas na face lingual do elemento dentário. **C-** Linhas verticais traçadas na região de furca entre a raiz vestibular e lingual do primeiro molar inferior, medindo a distância entre o cemento e a crista óssea alveolar da referida região 34

Figura 6. Fotomicrografia das medições histomorfométricas (50x). Três medições na área de furca, sendo uma mais próxima da distal, uma na região central e outra mais próximo a mesial. As medidas foram realizadas tendo como referência o cemento e a crista óssea da região de furca 36

Figura 7. Desenho experimental da primeira e da segunda parte do estudo. Na parte 1 a administração do sildenafila ocorreu do 1º ao 30º dia do estudo. Na parte 2 a administração do sildenafila ocorreu a partir do 15º até o 30º dia do estudo 41

Figura 8. Imagem microtomográfica do primeiro molar inferior. **A-** Vista de um corte coronal da raiz mesial, previamente selecionada em um corte sagital. **B-** Linhas horizontais traçadas na raiz mesial para delimitar a junção amelocementária e a crista óssea alveolar. A linha vertical mede a distância entre as referidas regiões anatômicas na face lingual do elemento dentário. **C-** Linhas verticais traçadas na região de furca entre a raiz vestibular e lingual do primeiro molar inferior, medindo a distância entre o cemento e a crista óssea alveolar da referida região..... 43

Figura 9. Fotomicrografia das medições histomorfométricas (50x). Três medições na área de furca, sendo uma mais próxima da distal, uma na região central e outra mais próximo a mesial. As medidas foram realizadas tendo como referência o cemento e a crista óssea da região de furca 45

Figura 10. Fotomicrografias mostrando o processo inflamatório na região de furca na parte 2 do estudo. **A-** Reação inflamatória intensa com presença de microabscesso e área de osso necrótico na área de furca do grupo que recebeu placebo (hematoxilina-eosina, aumento original, 100x). **B-** Reação inflamatória de intensidade moderada na região de furca do grupo tratado com sildenafila (hematoxilina-eosina, aumento original, 100x) 48

Figura 11. Correlação histológica e microtomográfica do primeiro molar inferior na Parte 1 do estudo. **A, B, C-** Fotomicrografias do primeiro molar inferior dos grupos Placebo Prev, Controle Prev e Sildenafila Prev, respectivamente. Em A e C pode observar um padrão de reabsorção óssea semelhante, principalmente na região de furca. Em B a altura do osso alveolar apresenta-se preservada (hematoxilina-eosina, aumento original, 20X). **D, E e F-** Imagens microtomográficas vistas em corte sagital do primeiro molar inferior dos grupos Placebo Prev, Controle Prev e Sildenafila Prev, respectivamente. Em D e F pode-se observar uma reabsorção óssea principalmente na região de furca que não é verificada em E 49

Figura 12. Correlação histológica e microtomográfica do primeiro molar inferior na Parte 2 do estudo. **A, B e C-** Fotomicrografias do primeiro molar inferior dos grupos Placebo Trat, Controle Trat e Sildenafila Trat, respectivamente (hematoxilina-eosina, aumento original, 20X). Em A pode-se observar uma intensa reabsorção óssea acompanhada da formação de microabscessos na região de furca. A imagem C também apresenta uma reabsorção óssea intensa, aparentemente com um menor grau de inflamação quando comparado com a figura 11A. **D, E e F-** Imagens microtomográficas vistas em corte sagital do primeiro molar inferior dos grupos Placebo Trat, Controle Trat e Sildenafila Trat, respectivamente. Em D e F pode-se observar uma reabsorção óssea principalmente na região de furca que não é verificada em E 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio-padrão da reabsorção óssea das variáveis estudadas por meio de microtomografia computadorizada, bem como valor de *p* referente a comparação entre os grupos da Parte 1 do estudo 46

Tabela 2. Médias e desvio-padrão da reabsorção óssea das variáveis estudadas por meio de microtomografia computadorizada, bem como valor de *p* referente a comparação entre os grupos da Parte 2 do estudo 46

Tabela 3. Média dos escores do grau de inflamação da área de furca na parte 1 e 2 do estudo 47

Tabela 4. Médias histomorfométricas da reabsorção óssea na área de furca da Parte 1 e 2 do estudo 48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ºC	Graus Celsius
cm	Centímetro
Cox-2	Ciclooxigenase 2
DP	Doença periodontal
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de Tetrasódio
g	Gramas
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IL	Interleucina
mg/kg	Miligramas por quilogramas
mg/kg/dia	Miligramas por quilogramas por dia
microCT	Microtomografia computadorizada
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinases da matriz
n	Número
ON	Óxido Nítrico
OPG	Osteoprotegerina
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante receptor ativador do fator nuclear kapa B
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO 18

2 INTRODUÇÃO 20

3 REVISÃO DA LITERATURA 22

3.1 Doença periodontal e reparação dos tecidos periodontais 22

3.2 Óxido nítrico e o seu papel na doença periodontal 25

3.3 Citrato de Sildenafila e o seu efeito na reparação tecidual 26

4 OBJETIVOS 30

4.1 Objetivos gerais 30

4.2 Objetivos específicos 30

5 METODOLOGIA 31

5.1 Implicações éticas 31

5.2 Caracterização do estudo 31

5.3 Local 31

5.4 Amostra 31

5.5 Indução da doença periodontal 31

5.6 Delineamento do estudo 32

5.7 Administração do citrato de sildenafila 33

5.8 Eutanásia dos animais e processamento da amostras 34

5.9 Análise por microtomografia computadorizada (microCT) 34

5.10 Análise histológica 37

5.11 Análise histomorfométrica 37

5.12 Análise estatística 38

6 EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFILA NA PREVENÇÃO E PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E HISTOLÓGICA 39

7 CONCLUSÃO 61

REFERÊNCIAS 62

ANEXO – Parecer do comitê de ética 65

1 APRESENTAÇÃO

A descoberta do citrato de sildenafila representou um grande avanço no tratamento da disfunção erétil. Ele é conhecido como um potente inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 específica, enzima esta que tem participação efetiva em alguns processos celulares, tais como a inflamação.

Ultimamente, este fármaco vem sendo utilizado em diversos outros processos patológicos, tais como hipertensão arterial pulmonar (HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008), injurias gástricas (DUFFIN, SHAW e ROSSI, 2008), cicatrização de feridas (DERICI et al., 2010), inflamações causadas por colites experimentais (KARAKOYUN et al, 2011), lesões pulmonares (CADIRCI et al., 2011), hepáticas e renais (GOKAKIN et al., 2013). Em todas essas situações, esse fármaco mostra efeitos positivos na diminuição do processo inflamatório e redução do estresse oxidativo, consequentemente reduzindo o dano tecidual.

Sabidamente, o processo inflamatório é um fator primordial na destruição dos tecidos periodontais decorrente da periodontite. A doença periodontal é caracterizada como uma doença infectoinflamatória, originada por produtos da interação entre o biofilme e a resposta inflamatória e imune do hospedeiro. Diversas terapias alternativas, visando modular a resposta do hospedeiro frente à doença periodontal, têm sido estudadas. Dentre elas, podemos citar vários estudos utilizando fármacos das mais diferentes classes, tais como: probióticos (MATSUBARA et al., 2016), sivastatina (BRADLEY et al., 2016), atorvastatina (SOUSA et al., 2016), resveratrol e curcumina associados ou não (CORRÊA et al., 2017), fucoxantina (KOSE et al., 2016) e fluoxetina (AGUIAR et al., 2013).

A terapia periodontal básica, que consiste da raspagem e do alisamento coronoradicular, ainda é considerado a modalidade terapêutica convencional e eficaz para o tratamento da periodontite. Entretanto, tratamentos adjuvantes usualmente são necessários pela limitação de acesso a áreas de furca, concavidades, sulcos, sítios distais de molares e bolsas profundas encontradas durante a terapia periodontal convencional. Considerando as evidências que mostram que o citrato de sildenafila inibe significativamente o estresse oxidativo (AYTEN et al., 2008; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008; KARAKOYUN et al, 2011), com redução da severidade do processo inflamatório (CADIRCI et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013), justificou-se avaliar, de forma pioneira, os efeitos dessa

droga na evolução da doença periodontal induzida em ratos, a fim de se ter uma terapia adjuvante ao tratamento convencional.

Baseados nesses achados o presente trabalho, trata-se de um estudo experimental, e se justifica pela necessidade de se conhecer o efeito da administração diária de citrato de sildenafila frente ao processo inflamatório que a doença periodontal acarreta. Visto que, nada se sabe sobre os efeitos desta droga em patologias relacionadas à cavidade oral. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da referida droga na prevenção e progressão da periodontite experimental em ratos induzida por ligadura.

2 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um dos dois maiores problemas dentários, seguido de cárie, que afetam a população humana com altas taxas de prevalência. A periodontite é uma inflamação que se estende profundamente nos tecidos, causando perda do tecido conjuntivo de suporte e do osso alveolar (JIANG et al., 2016).

Atualmente, a etiologia da periodontite é entendida como sendo resultado de um desequilíbrio causado pela interação entre uma infecção bacteriana complexa e por uma resposta imunoinflamatória exarcebada do hospedeiro. O processo inflamatório periodontal inicialmente tem um papel protetor contra a invasão bacteriana. Contudo, torna-se destrutivo devido a uma prolongada sobre-expressão de mediadores tais como IL-1 e TNF, produção de prostaglandinas, síntese de enzimas líticas e ativação de osteoclastos, tendo como conseqüência a reabsorção do osso alveolar e perda de inserção (FEITOSA et al., 2009; NG et al., 2016).

Os principais objetivos do tratamento da periodontite são remover o biofilme bacteriano, reduzir a inflamação presente nos tecidos periodontais e tratar as seqüelas subjacentes. Apesar da terapia periodontal não cirurgica ser bastante eficiente no tratamento da doença peridontal, busca-se agentes adjuvantes para auxiliar na modulação da resposta inflamatóra do hospedeiro e consequentemente a redução do processo inflamatório e da destruição tecidual (ARAÚJO JUNIOR et al., 2013; BRANCO DE ALMEIDA et al., 2012).

O citrato de sildenafila, originalmente utilizado para o tratamento da disfunção erétil, tem demonstrado ação antiinflamatória benéfica em modelos experimentais (CADIRCI et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013). Este fármaco atua como um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5, enzima produzida a partir do óxido nítrico gerado pelo estimulo sexual e é responsável por degradar o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), fazendo com que o cálcio intracelular presente na musculatura lisa do corpo cavernoso seja mantido, dificultando assim a ereção. O sildenafila atua na manutenção do GMPc, facilitando a degradação do cálcio e, consequentemente, favorecendo a ereção através da via do oxido nítrico (ON) (KARAKOYUN et al., 2011).

Nos últimos anos, estudos avaliaram o uso do sildenafila em diversas doenças além da disfunção erétil. Verificou-se ações antiinflamatórias benéficas em

colite aguda (KARAKOYUN et al, 2011) e em modelos de fibrose pulmonar induzida em ratos (YILDIRIM et al, 2010), prevenção de danos de lesões inflamatórias renais em ratos diabéticos (JEONG et al., 2009), por meio da prevenção da peroxidação lipídica, diminuição na produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos (KARAKOYUN et al, 2011; YILDIRIM et al, 2010) e redução da adesão e manutenção de leucócitos no fluxo sanguíneo (SANTOS et al., 2005), inibição do estresse oxidativo e da severidade da reação inflamatória no tecido pulmonar de ratos submetidos a queimaduras experimentais (GOKAKIN et al., 2013).

Sabendo que a doença periodontal promove a destruição progressiva dos tecidos periodontais, através de uma resposta inflamatória crônica ao biofilme, induzindo a migração e ativação de células, além da expressão de citocinas e síntese de ON (WEI et al, 2010), e que o citrato de sildenafila promove um equilíbrio no processo de oxidação e antioxidação, consequentemente reduzindo o estresse oxidativo em eventos inflamatórios (CADIRCI et al., 2011; KARAKOYUN et al, 2011; AYTEN et al., 2008; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008), como ocorre na doença periodontal. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos desta droga na prevenção e na progressão da periodontite induzida em ratos, a partir de uma analise microtomográfica e histológica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença periodontal e reparação dos tecidos periodontais

A cavidade oral abriga pelo menos 500 espécies de microorganismos que vivem predominantemente organizadas na forma de biofilmes. Doenças dentárias e gengivais, incluindo cáries e doenças periodontais, estão associadas com placa dentária e a um biofilme polimicrobiano acentuado na superfície dental (NG et al., 2016).

A doença periodontal é a doença oral mais comum em todo o mundo. Alguns autores mostram uma prevalência de cerca de 50 – 70% em indivíduos adultos com mais de 30 anos (JIANG et al., 2016). Além de possuir alta prevalência, apresenta também uma patogênese bastante complexa e distinta das demais doenças de caráter crônico infeccioso.

Diferentes complexos microbianos são associados com a sequência de colonização da superfície dental, assim como com a severidade da doença periodontal. Os biofilmes polimicrobianos são comunidades microbianas complexas e dinâmicas formadas por duas ou mais espécies bacterianas que são importantes para a persistência e proliferação dos microorganismos presentes naquele ambiente (LINDHE et al., 2010; MATSUBARA et al., 2016). Na cavidade oral, as interações entre as principais espécies bacterianas orais, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, são essenciais para a progressão da periodontite crônica (NG et al., 2016).

Além da presença do biofilme, a patogênese da doença periodontal envolve uma interação entre fatores imunológicos e ambientais, estando associada a uma resposta imunoinflamatória exacerbada do hospedeiro. Como conseqüência, resulta em uma superprodução de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e oxigênio reativo (BRADLEY et al, 2016). O oxido nítrico (ON) desempenha papel importante na evolução da doença periodontal, principalmente no que diz respeito à degradação dos tecidos. A doença periodontal promove a destruição progressiva dos tecidos periodontais, através de uma resposta inflamatória crônica ao biofilme, induzindo a migração e ativação de células de defesa, além da expressão de citocinas e síntese de ON (WEI et al, 2010).

A Interleucina-1β (IL-1β) e o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) são mediadores pró-inflamatórios comuns que causam danos ao tecido periodontal

através da diminuição da expressão de osteoprotegerina favorecendo a destruição dos tecidos periodontais e reabsorção do osso alveolar (KARAKAN et al., 2017). Essa destruição dos tecidos de suporte dentário, como o ligamento periodontal, cemento e osso alveolar, é uma das principais características clínicas da doença periodontal, resultando em mobilidade dentária, diminuição do nível clínico de inserção e perda dentária quando não tratada (LINDHE et al., 2010).

O tratamento da doença periodontal ainda consiste na eliminação do agente infeccioso através de procedimentos de raspagem, profilaxia e em medidas preventivas, tais como instrução de higiente oral (MATSUBARA et al., 2016). Dada à importância da ativação das células inflamatórias envolvidas na progressão da doença periodontal, existe a necessidade de um método adjuvante ao tratamento convencional, com o objetivo de diminuir o processo inflamatório e modular a resposta do hospedeiro levando, assim, a uma menor destruição tecidual (ARAÚJO et al., 2013).

Diversas terapias adjuvantes são estudadas na tentativa de avaliar o seu efeito no tratamento periodontal, sendo estas de cunho farmacológico ou não. Na literatura, encontram-se estudos avaliando o laser, a terapia fotodinâmica (AKRAM et al., 2016) e probióticos (MATSUBARA et al., 2016). Da mesma forma, diversos fármacos estão sendo testados, buscando verificar qual a influência que os mesmos exercem no curso da doença periodontal (BRANCO DE ALMEIDA et al., 2012; MESSORA et al., 2016).

Buscando avaliar o efeito de substâncias deviradas de plantas que apresentam propriedades imunomodulatórias, Corrêa et al. (2017) investigaram o efeito da administração de resveratrol e curcumina, associados ou não, sobre a progressão da periodontite experimental em ratos. Quarenta ratos foram distribuidos nos seguintes grupos: G1, periodontite experimental com administração de placebo. G2, periodontite experimental tratada com resveratrol 10mg/kg/dia. G3, periodontite experimental com administração de curcumina 100mg/kg/dia. G4, periodontite experimental tratada com resveratrol 10mg/kg/dia associado a curcumina 100mg/kg/dia. Os animais receberam droga e/ou placebo por 30 dias e a indução da doença periodontal ocorreu no primeiro dia de administração de droga. A partir da analise dos espécimes, verificaram-se valores maiores de perda óssea alveolar no grupo placebo ($p<0,05$) quando comparado com os demais grupos (grupos teste), porém não houve diferença significantivas entre os grupos testes.

Araújo Junior et al. (2013) objetivaram avaliar os efeitos do tratamento com a atorvastatina na doença periodontal. Ratos Wistar machos foram distribuídos em cinco grupos (n=10 por grupo): 1- tratamento sem ligadura, 2- apenas ligadura, 3- ligadura mais 1 mg/kg/dia de atorvastatina durante 10 dias, 4- ligadura mais 5 mg/kg/dia de atorvastatina durante 10 dias e 5- ligadura mais 10 mg/kg/dia de atorvastatina durante 10 dias. Após o curso do tratamento, o tecido periodontal dos animais foi analisado para determinação da perda óssea alveolar. O grupo tratado com 10 mg/kg/dia, mostrou uma redução significativa na média da perda óssea alveolar ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo da ligadura, a partir de uma análise morfométrica. Similarmente, neste mesmo grupo (10 mg/kg/dia), diminuiu significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α ($p < 0,05$). Além disso, MMP-2, MMP-9, RANKL / RANK e COX-2 foram todos regulados pelo tratamento com atorvastatina, enquanto a expressão de OPG foi aumentada. Os resultados suportam um papel da atorvastatina para reduzir a perda óssea, resposta inflamatória, estresse oxidativo e expressão de proteínas de matriz extracelular, enquanto reduz RANK / RANKL e aumenta a OPG na doença periodontal.

A fim de avaliar o efeito da sinvastatina sobre perdas ósseas e inflamações experimentais de periodontite, Bradley et al. (2016) submeteram quarenta ratos a periodontite experimental induzida por ligadura entre o primeiro e o segundo molar superior. Os grupos receberam a ligadura e foram tratados com três doses semanais de: 1) Veículo; 2) 0,5 mg de sinvastatina; 3) 1,0 mg de sinvastatina; 4) 1,5 mg de sinvastatina; ou 5) apenas ligadura. Molares contralaterais serviram como controles não manipulados. Quatro semanas após a indução da periodontite, os animais foram eutanasiados e os espécimes avaliados por microtomografia computadorizada e histologia. Todas as doses de sinvastatina utilizadas no estudo reduziram a perda óssea alveolar, principalmente a dose de 1,5 mg/kg, quando comparadas com o grupo que recebeu apenas a ligadura. A dose de 1,5 mg/kg também reduziu a percentagem de neutrófilos e aumentou a quantidade de tecido conjuntivo não inflamado na área interproximal em comparação com o grupo que recebeu veículo associado a ligadura. Os autores concluíram que doses de 1,5 mg/kg de sinvastatina diminuem a quantidade de perda óssea e inflamação na periodontite experimental em ratos.

Objetivando avaliar o efeito do telmisartan na inflamação, oxidação e expressão de metaloproteinases de matriz, RANKL, RANK e OPG no tecido

periodontal de um modelo de rato para periodontite induzida por ligadura, Araújo et al. (2013) dividiram 50 ratos em cinco grupos de 10 ratos cada: 1-tratamento sem ligadura, 2- apenas ligadura, 3- ligadura mais 1 mg/kg/dia de telmisartan durante 10 dias, 4- ligadura mais 5 mg/kg/dia de telmisartan durante 10 dias e 5- ligadura mais 10 mg/kg/dia de telmisartan durante 10 dias. O tecido periodontal foi analisado por histopatologia, análise imunoistoquímica da COX-2, MMP-2, MMP-9 e da via RANKL/RANK/OPG e por ELISA dos níveis de IL-1β, IL-10, TNF-α, mieloperoxidase (MPO), malonaldeído (MDA) e glutationa. O tratamento com 10 mg/kg de telmisartan resultou em concentrações reduzidas de MPO, MDA ($p < 0,05$), citocina pró-inflamatória IL-1β ($p < 0,05$), de MMP-2, MMP-9, RANK, RANKL e COX-2; e um aumento na OPG. Os níveis de TNF-α foram significativamente reduzidos em todos os grupos tratados com telmisartan.

3.2 Oxido nítrico e o seu papel na doença periodontal

O ON é um radical livre que desempenha um papel importante na resposta de infecção nos tecidos orais. Ele é produzido e liberado predominantemente por neutrófilos e macrófagos, bem como fibroblastos e células endoteliais (GULLU et al., 2005). O ON é sintetizado por uma família de isoenzimas chamada ON sintase (ONS). Três isoformas de ONS são descritas, sendo uma ONS induzida e duas ONS constitutivas (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

As ONSs constitutivas são dependentes da presença citosólica de cálcio, esse fator ocorre a partir de diversos estímulos fisiológicos. A ONS induzida tem sua produção estimulada por citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo. Por ser independente da concentração intracelular de cálcio, a ONS induzida libera uma maior quantidade de ON e por períodos mais longos. O ON produzido em altas concentrações atua como uma molécula citotóxica contra microorganismos e células tumorais. Por outro lado, essa liberação aumentada de ON produz efeitos biológicos, tais como vasodilatação e danos teciduais ao hospedeiro, resultando em apoptose, lesão tecidual e dor (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

O ON possui uma participação no metabolimo ósseo descrito na literatura, a produção constitutiva de pequenas quantidades de ON por osteoblastos desempenha um importante papel na regulação do crescimento dessas células,

enquanto altas concentrações de ON, produzidas pela ONS induzida, via ativação de citocinas, estão associadas à redução da formação óssea. Na cavidade oral, acredita-se que quantidades de ON presente nos tecidos periodontais e saliva façam parte dos mecanismos naturais não específicos de defesa contra bactérias patogênicas, enquanto maiores concentrações de ON contribuam para a destruição tecidual, inclusive periodontal (ÖZDEMIR et al., 2016).

Segundo diversos autores (BOSCA et al., 2016; GULLU et al., 2005), o ON é produzido e participa diretamente da doença periodontal. É sugerido que a sua produção ocorra em resposta aos patógenos e aos agentes inflamatórios presentes na doença periodontal (BOSCA et al., 2016; GULLU et al., 2005; KENDAL, MARSHALL e BARTOLD, 2001; ÖZDEMIR et al., 2016). Quando ON é produzido localmente e em grandes quantidades, ele pode atuar como uma molécula citotóxica contra patógenos microbianos, bem como células circundantes, resultando em um maior agravamento da destruição dos tecidos periodontais (KENDAL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

3.3 Citrato de sildenafila e o seu efeito na reparação tecidual

Por muito tempo o citrato de sildenafila é empregado no tratamento da disfunção erétil, representando um grande avanço no tratamento desse distúrbio. Ele atua como um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5. Essa enzima é produzida a partir do ON gerado pelo estimulo sexual e é responsável por degradar o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), fazendo com que o cálcio intracelular presente na musculatura lisa do corpo cavernoso seja mantido, dificultando assim o influxo sanguíneo e consequentemente a ereção. O sildenafila atua na manutenção do GMPc, facilitando a degradação do cálcio e favorecendo a ereção através da via ON (KARAKOYUN et al., 2011).

Nos últimos anos, a literatura tem mostrado a utilização do sildenafila em diversas patologias além da disfunção erétil. Dados de dois estudos demostraram ações antiinflamatórias benéficas do sildenafila em colite aguda e em modelos de fibrose pulmonar induzida em ratos através da prevenção da peroxidação lipídica, da produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos (KARAKOYUN et al, 2011; YILDIRIM et al, 2010). Um outro estudo mostrou que o sildenafila, atuando através de um mecanismo dependente de ON, inibiu gastropatia induzida por indometacina,

possivelmente através de uma redução da adesão e a manutenção de leucócitos no fluxo sanguíneo gástrico (SANTOS et al., 2005). Como observado por Jeong et al. (2009), o ON preveniu significativamente os danos de lesões inflamatórias renais em ratos diabéticos. Outro estudo revelou que o sildenafila, pela sua seletiva e potente inibição da fosfodiesterase 5, inibiu significativamente o estresse oxidativo e a severidade da reação inflamatória no tecido pulmonar de ratos submetidos a queimaduras experimentais (GOKAKIN et al., 2013).

Além disso, os efeitos positivos do sildenafila tem sido demonstrado promovendo um equilíbrio no processo de oxidação e antioxidação, consequentemente reduzindo o estresse oxidativo em eventos inflamatórios (AYTEN et al., 2008; CADIRCI et al., 2011; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008; KARAKOYUN et al, 2011). Por isso, pode ser um aliado no tratamento da doença periodontal, visto que, a mesma apresenta um carater inflamatório crônico.

Objetivando investigar o efeito do citrato de sildenafila no processo de cicatrização de feridas na parede abdominal de ratos, Derici et al. (2010) utilizaram 100 ratos Wistar adultos divididos em dois grupos. O grupo controle (n=50) recebeu água e comida livre até 12h antes do procedimento cirúrgico. O grupo experimental (n=50) recebeu administração diária de 10mg/kg da droga, por via oral, durante 10 dias até 12h antes da cirurgia. Todos os animais foram anestesiados e uma laparotomia de 4 cm de comprimento na linha média foi realizada. Foram eutanasiados 10 animais de cada grupo nos tempos experimentais de 4, 7, 14, 21 e 35 dias de pós-operatório. A análise de resistência à ruptura foi medida e as feridas da incisão abdominal foram examinadas histologicamente. A força de ruptura da incisão mediana, inflamação aguda no 14º dia de pós-operatório e neovascularização nos dias 7, 14, 21 e 35 do pós-operatório, apresentaram resultados significativamente mais favoráveis no grupo experimental. Dessa forma, os autores concluíram que o sildenafila pode ser utilizado como um fator de apoio na cicatrização de feridas, conferindo benefício no processo de cicatrização, aumentando significativamente a resistência da fáscia abdominal e neovascularização.

Sabendo que queimaduras graves produzem mediadores bioquímicos, tais como espécies reativas de oxigênio, podendo levar a peroxidação lipídica com papel importante na formação de lesões pulmonares agudas, Gokakin et al. (2013) objetivaram avaliar os efeitos de diferentes dosagens de sildenafila em lesões

pulmonares agudas devido a grave queimadura em ratos. Vinte e quatro ratos foram submetidos a 30% de lesão por escamação da área de superfície corporal total e foram divididos aleatoriamente em três grupos iguais: grupo controle, grupos 10 e 20 mg/kg de sildenafila. Níveis de atividades de glutationa peroxidase, catalase, estresse oxidativo total e capacidade antioxidante total foram medidos e o índice de estresse oxidativo calculado. Utilizou-se um sistema de pontuação semi-quantitativo para a avaliação dos achados histopatológicos. Os achados revelaram que o sildenafila aumentou a atividade da glutationa peroxidase, catalase, capacidade antioxidante total e diminuiu o estresse oxidativo e os escores de inflamação nos pulmões. Segundo os autores, o citrato de sildenafila protege contra a inflamação e o estresse oxidativo e que a dose 10 mg/kg/dia parece ser aparentemente superior à de 20 mg/kg/dia para o tratamento da condição estudada.

Cadirci et al. (2011) investigaram o efeito protetor do citrato de sildenafila na sepse induzida por ligadura e punção cecal em ratos. Foram utilizados 40 animais divididos em 4 grupos (n=10): 1- ligadura e punção cecal tratada com 10 mg/kg de sildenafila; 2- ligadura e punção cecal tratada com 20 mg/kg de sildenafila; 3- apenas ligadura e punção cecal; 4- grupo controle pseudo operado (receberam laparotomia e exploração do ceco, mas a ligadura e a punção cecal não foram realizadas). Todos os grupos foram eutanasiados 16h após o procedimento e as amostras de pulmão, rim e sangue foram analisadas histológica e bioquimicamente. A partir da análise, verificou-se que o tratamento com 20mg/kg de sildenafila melhorou o estado bioquímico dos pulmões e dos rins. A análise histopatológica revelou diferenças significativas nos escores de inflamação entre o grupo de sepse (grupo 3) e o grupo tratado com sildenafila 20 mg/kg (grupo 2), sendo observado um menor grau de inflamação no grupo tratado com 20 mg/kg de sildenafila (grupo 2). O tratamento com sildenafila (10 e 20 mg/kg) diminuiu o fator de necrose tumoral comparado com o grupo que não recebeu a droga (grupo 3). Os autores indicaram que o sildenafila é um agente protetor na prevenção de danos pulmonares e renais causados por sepse induzida, através da manutenção do estado oxidante-anti-oxidante e diminuição do nível de fator de necrose tumoral.

Histing et al., (2011) avaliaram a influência do citrato de sildenafila na expressão de fatores de crescimento angiogênicos e a formação óssea durante o processo de cicatrização da fratura. Os autores utilizaram um modelo de fratura fechada de fêmur de murino, utilizando-se técnicas radiológicas, biomecânicas,

histomorfométricas e bioquímicas, analisando 2 e 5 semanas após a fratura. Trinta ratos receberam por via oral 5 mg/kg de sildenafila diariamente e o grupo controle (n=30 por grupo) recebeu dose equivalente de veículo. Após duas semanas de cicatrização da fratura, o sildenafila aumentou significativamente a consolidação das partes ósseas, conforme determinado radiológica e histologicamente. Isto resultou em um aumento da rigidez biomecânica em comparação com o controle. Uma menor área de calo ósseo com uma quantidade de tecido cartilaginoso indicou um processo de cicatrização acelerado no grupo tratado. Após cinco semanas as diferenças foram semelhantes, demonstrando sucesso em ambos os grupos. Os autores relataram, baseados nos seus achados, que o tratamento com sildenafila acelerou a cicatrização inicial da fratura, aumentando a formação óssea.

Cakmak et al. (2014) avaliaram a ação do sildenafila no processo de cicatrização de feridas crônicas e defeitos de espessura total em ratos. Para isso, 72 ratos Wistar foram divididos em dois grupos (n=36 cada), sendo um controle e um teste, que recebeu 10 mg/kg diariamente de sildenafila, por via oral, iniciando 2 horas após a confecção do defeito. As feridas de espessura total foram confeccionadas no dorso dos animais, medindo 1,5 x 1,5 cm. A avaliação da cicatrização ocorreu nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 após o procedimento cirúrgico. Com base na análise macroscópica visual e histológica, o período médio de cicatrização das feridas no grupo controle foi de 17,89 dias e de 14,56 dias no grupo teste ($p = 0,001$). A diferença da epitelização em defeitos de espessura total foi mais presente nos dias 5 e 11 do pós-operatório. No grupo tratado com citrato de sildenafila, no 7º dia, o defeito tinha o tamanho reduzido em 25 % e no dia 13, verificou-se uma contração de 38% maior da ferida quando comparado com o controle. Os autores concluíram que o citrato de sildenafila administrado por via oral é efetivo no tratamento de defeitos de espessura total e feridas crônicas em ratos.

Por todas as evidências de ação anti-inflamatória e aumento da capacidade de reparação tecidual, o citrato de sildenafila pode ser um medicamento importante no controle da doença periodontal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Verificar a ação do citrato de sildenafila, utilizando uma dose de administração de 10mg/kg/dia, na periodontite experimental em ratos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito na prevenção e na progressão do referido fármaco na periodontite experimental a partir de uma análise microtomográfica.
- Avaliar o efeito na prevenção e na progressão do referido fármaco na periodontite experimental a partir de uma análise histológica.
- Avaliar o efeito na prevenção e na progressão do referido fármaco na periodontite experimental a partir de uma análise histomorfométrica.

5 METODOLOGIA

5.1 Implicações Éticas

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Processo: 23076.043761/2013-09).

5.2 Caracterização do Estudo

Trata-se de um estudo de intervenção de caráter experimental *in vivo*.

5.3 Local

Toda a parte experimental do estudo, no que se refere à indução da doença periodontal, manutenção dos animais e administração da droga, foi conduzida no biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE. As imagens de microtomografia computadorizada e as lâminas histológicas foram confeccionadas no Departamento de Energia Nuclear e no Laboratório de Patologia Oral, respectivamente, ambos da UFPE.

5.4 Amostra

Foram utilizados no experimento 36 (trinta e seis) ratos (Rattus norvegicus, albinus) machos, da linhagem Wistar, com três meses de idade e pesando entre 250 e 300g. Os mesmos foram cedidos pelo biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.

5.5 Indução da doença periodontal

Para a indução da doença periodontal, os animais foram pesados e anestesiados pela administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,5 ml de cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP. Brasil) por cada 100 gramas de peso corporal. Após anestesia foi colocado um fio de sutura de seda estéril número 4.0 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) em volta do primeiro molar inferior esquerdo e acomodando-o no sulco gengival, de acordo com

a metodologia realizada em estudos prévios (BRADLEY et al., 2016; KARAKAN et al., 2017; KOSE et al., 2016).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sem restrição de ração e água, sob condições de temperatura ambiente (21-23 ºC) e ciclos de 12h de claro/escuro.

5.6 Delineamento do estudo

O referido estudo foi dividido em dois grupos, contendo 03 (três) subgrupos cada.

Grupo I – Com o objetivo de avaliar o efeito do citrato de sildenafila na prevenção da periodontite experimental, o grupo 1, foi composto por 18 (dezoito) animais distribuídos em 03 (três) subgrupos contendo 06 (seis) animais em cada, seguindo o esquema abaixo (Figura 1):

Grupo Placebo Prevenção (PlaPrev) (Controle negativo) – Administração de veículo por via oral e indução de doença periodontal.

Grupo Controle Prevenção (ControlPrev) (Controle positivo) – Administração via oral de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente durante todo o estudo, sem indução de doença periodontal.

Grupo Sildenafila Prevenção (SilPrev) – Administração via oral de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente durante todo o estudo e indução da doença periodontal.

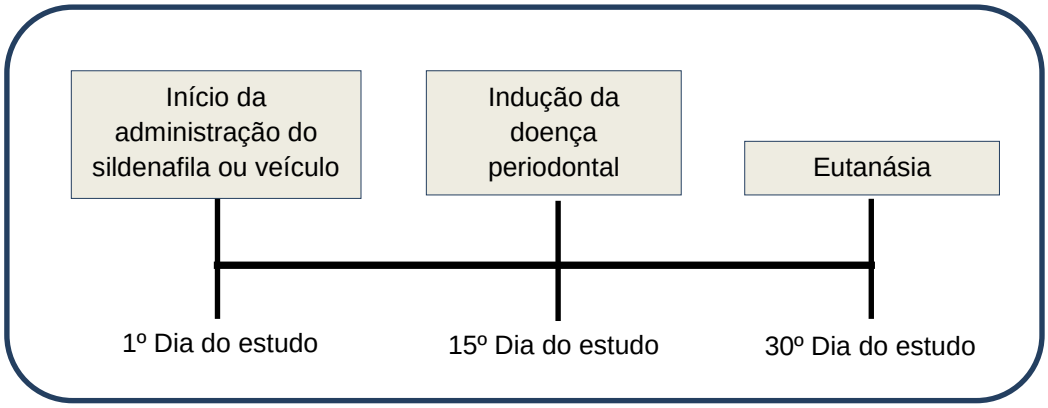

Figura 1. Desenho experimental do primeiro grupo do estudo. A administração do sildenafila ocorreu do 1º até o 30º dia do estudo.

Grupo II – Com o objetivo de avaliar o efeito do citrato de sildenafila na progressão da periodontite experimental, o grupo 2 do estudo, foi composta por 18 (dezoito) animais distribuídos em 03 (três) subgrupos contendo 06 (seis) animais em cada seguindo o esquema ilustrado na figura 2:

Grupo Placebo Tratamento (PlaTrat) (Controle negativo) – Indução de doença periodontal e administração de veículo por via oral diariamente a partir do 15º dia do estudo.

Grupo Controle Tratamento (ControlTrat) (Controle positivo) – Administração de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente a partir do 15º dia do estudo, sem indução de doença periodontal.

Grupo Sildenafila Tratamento (SilTrat) – Indução da doença periodontal e administração via oral de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente a partir do 15º dia do estudo.

Figura 2. Desenho experimental do segundo grupo do estudo. A administração do sildenafila ocorreu a partir do 15º até o 30º dia do estudo.

5.7 Administração do citrato de sildenafila

O citrato de sildenafila foi obtido a partir da manipulação da matéria bruta e foi utilizado como veículo para sua formulação um xarope dietético isento de sacarose com baixa viscosidade (composição: água destilada, xantana, citrato de sódio, sorbato de potássio, metilparabeno) e administrado por gavagem (Figura 3) na concentração de 10 mg/kg/dia. Sua formulação foi preparada em uma farmácia de manipulação comercial (Farmácia Dona Fórmula, Recife, PE, Brasil) e a cada 10 dias, novas formulações foram produzidas para evitar a precipitação da droga. A

utilização desse veículo para a preparação do fármaco se deu pela característica de pouca solubilidade da droga em água. A apresentação farmacêutica na forma de xarope, além de melhorar a solubilidade do referido fármaco, favorece a sua absorção (BADWAN et al., 2001).

Figura 3. Imobilização do animal para administração da droga ou veículo através da técnica de gavagem.

5.8 Eutanásia dos animais e processamento das amostras

Decorrido o período do estudo, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com cloridrato de quetamina administrada por via intramuscular. As mandíbulas foram removidas, dissecadas e fixadas com formol tamponado a 10% por 48h.

5.9 Análise por microtomografia computadorizada (microCT)

Os espécimes foram submetidos à analise por microCT, com o objetivo de quantificar a perda óssea alveolar. As peças foram cuidadosamente transportadas para o microtomógrafo com o auxilio de uma pinça clínica e o excesso de formol removido com papel toalha absorvente. Os espécimes foram aprisionados a partir do incisivo central por uma pinça apropriada do Microtomógrafo para que toda mandíbula fosse captada pelo receptor (Figura 4).

Para exposição das amostras, foi utilizado um tomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST *microfocos* (EUA) no Laboratório de Tomografia Computadorizada (LTC) do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X (NENDARX) do Departamento de Energia Nuclear da UFPE (Figura 4),

operando em 80 kV e 222 mA sem filtro e 500μs², utilizando protocolo com tamanho de voxel de 11 microns (μ) e tempo de exposição de 25 minutos.

Após exposição, as imagens foram reconstruídas utilizando o software XTEK-CT PRO 3D (Nikon, Reino Unido). A área de interesse foi delimitada e em seguida, as reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal) do volume selecionado foram importadas pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics Gmbh, Heidelberg, Alemanha), onde foi aplicado o filtro Gaussiano (3x3x3) com o objetivo de suavizar a presença de artefatos das imagens digitais.

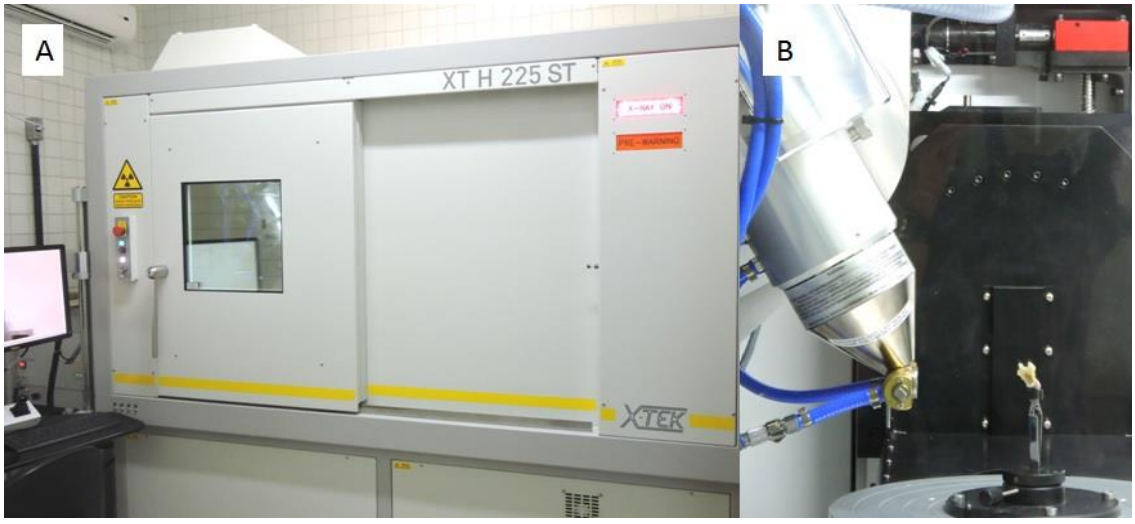

Figura 4. A- Tomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST *microfocos* do Laboratório de Tomografia Computadorizada do Núcleo em Ensaios Não Destrutivos de Aplicações de Raios X do Departamento de Energia Nuclear da UFPE. **B-** espécime sendo exposto aos feixes de raios x, o qual estava aprisionado a partir do incisivo central por uma pinça apropriada do Microtomógrafo.

As imagens reconstruídas foram analisadas pelo software ImageJ, versão 14.5 (National Institutes of Health, EUA). Para determinar a região a ser analisada, o corte axial marcou a região central do dente e o corte sagital foi rotacionado, usando ferramentas do software, até que as raízes estivessem perpendiculares ao solo. As mensurações foram realizadas no corte coronal, onde linhas horizontais foram traçadas: uma na altura da junção amelocementária e outra na parte mais coronal da crista óssea alveolar na raiz mesial e distal, por vestibular e por lingual. A distância vertical entre as duas linhas horizontais foi capturada em pixels e posteriormente convertida para milímetros. A face vestibular e lingual de todos os cortes coronais

foram medidos tanto na raíz distal quanto na mesial. A extensão da perda óssea na região da furca também foi analisada com três medidas realizadas do cemento da furca até o osso alveolar da mesma região (Figura 5).

Foi realizada uma varredura em todas as amostras e o grau de reabsorção óssea mensurado em toda a raiz mesial, distal e na região de furca a partir do corte coronal, mantendo a posição central obtida no corte axial. Os dados extraídos através das medições foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, EUA). Foram obtidas médias de reabsorção da face vestibular e lingual tanto para a raiz distal quanto para mesial. Além disso, criou-se a partir de uma média aritmética simples baseada nos dados das faces vestibular e lingual de cada raiz de forma isolada, uma média geral de reabsorção de cada uma das raízes (mesial e distal). Da mesma forma, uma média geral de reabsorção óssea foi conseguida através de uma média aritmética simples baseada na média geral da raiz mesial, distal e na média de reabsorção óssea na área de furca. Seis animais de cada grupo foram avaliados e tiveram todos os cortes microtomográficos mensurados para as três regiões estudadas (furca, raiz dista e mesial).

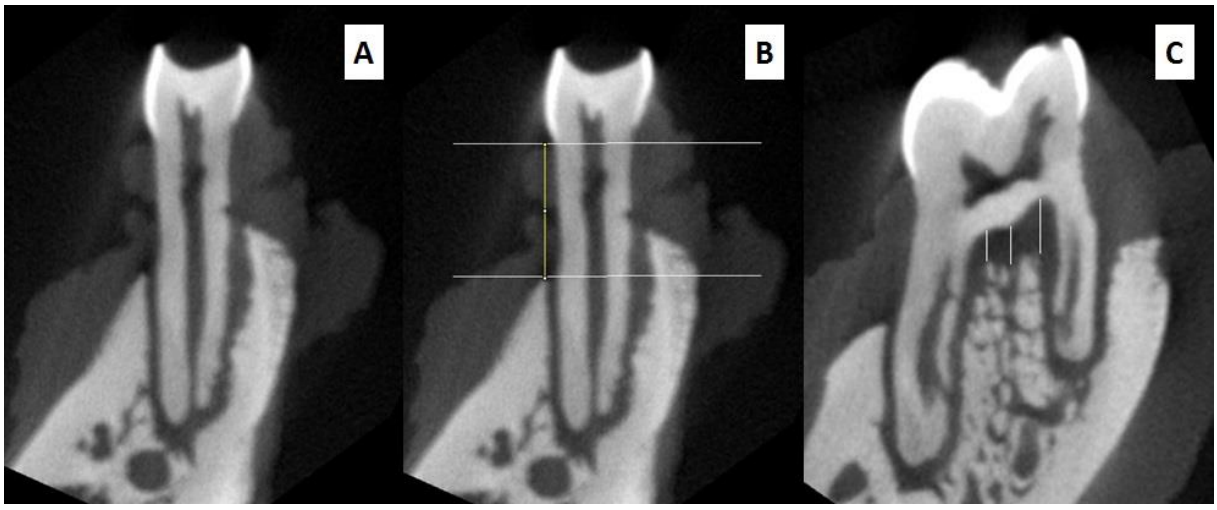

Figura 5. Imagem microtomográfica do primeiro molar inferior. **A-** Vista de um corte coronal da raiz mesial, previamente selecionada em um corte sagital. **B-** Linhas horizontais traçadas na raiz mesial para delimitar a junção amelocementária e a crista óssea alveolar. A linha vertical mede a distancia entre as referidas regiões anatômicas na face lingual do elemento dentário. **C-** Linhas verticais traçadas na

região de furca entre a raiz vestibular e lingual do primeiro molar inferior, medindo a distância entre o cemento e a crista óssea alveolar da referida região.

5.10 Análise histológica

Após a obtenção das imagens de microTC, os espécimes foram descalcificados com etilenodiaminotetracetato de tetrasódio (EDTA) a 5% até atingirem ponto de corte. Posteriormente, eles foram submetidos a processamento histológico convencional. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos de tecidos embebidos em parafina e corados em hematoxilina e eosina. A intensidade da reação inflamatória foi avaliada na região de furca, de acordo com os seguintes escores: 1- ausência de inflamação; 2- inflamação leve; 3- inflamação moderada e 4- inflamação intensa. Foi considerada inflamação leve quando poucas células inflamatórias eram encontradas distribuídas focal ou difusamente, moderada quando havia a presença de uma reação inflamatória focal e intensa quando a região avaliada apresentava uma grande quantidade de células inflamatórias distribuídas de forma difusa (BOSCA et al., 2016; CASTRO, KOSS e LÓPEZ, 2014).

5.11 Análise histomorfométrica

Posteriormente, as lâminas foram digitalizadas pelo escâner digital Pannoramic MIDI (3DHISTECH ltd., Budapest, Hungria). Utilizando o sotfware Pannoramic Viewer (3DHISTECH ltd., Budapest, Hungria), as lâminas digitalizadas foram avaliadas. Doze lâminas de cada grupo, sendo duas de cada animal contendo quatro cortes cada, foram analisadas utilizando o aumento de 50x. Para análise, 3 medidas verticais foram tomadas na região de furca, sendo uma mais distal, uma mais central e outra mais mesial, tendo como base o cemento da furca e a crista óssea alveolar da mesma região (Figura 6). Todos os dados foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, EUA).

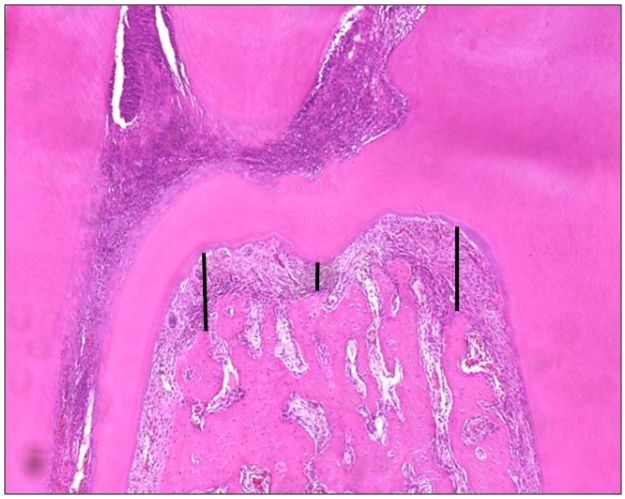

Figura 6. Fotomicrografia das medições histomorfométricas (50x). Três medições na área de furca, sendo uma mais próxima da distal, uma na região central e outra mais próxima a mesial. As medidas foram realizadas tendo como referência o cemento e a crista óssea da região de furca.

5.12 Análise estatística

Inicialmente, os dados obtidos foram avaliados por análise estatística descritiva. Os valores das mensurações de perda óssea na análise microtomográfica e histomorfométrica, além dos escores do grau de inflamação, foram submetidos a testes de normalidade (teste de shapiro wilk e Kolmogorov–Smirnov) e posteriormente estatística analítica utilizando o programa SPSS, versão 16.0. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi utilizando o teste T para amostras não pareadas. Porém para as que não possuíram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann Whitney. Em ambos os testes foi considerado um nível de significância de 95% ($p<0.05$).

6 EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFILA NA PREVENÇÃO E PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS: ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E HISTOLÓGICA

Diego Moura Soares[1]

[1]Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, Recife, Pernambuco, Brasil.

Abstract

Objective: Investigate the effect of sildenafil citrate (SC) on theprevention and progression of experimental periodontitis (EP).

Methods: Group 1 – SC 10 mg/kg was administered to 18 rats and EP was induced after 15 days, with administration of the drug for an additional 15 days; Group 2 – (n=18) the PE was induced previously and 15 days after induction, the daily administration of the drug was initiated and maintained for another 15 days. In both groups, the animals were distributed into three subgroups: Placebo – daily doses of vehicle and the induction of EP; Control – daily doses of SC without the induction of EP; Sildenafil – induction of EP and daily doses of sildenafil. EP was induced in the mandibular first molar through ligature. The animals were euthanized and the mandibles analyzed using microCT, histology and histomorphometry.

Results: In group 1, no significant differences were observed when comparing the group that received vehicle associated to PE with the drug-treated group, in none of the analyzes performed. The microCT analysis, group 2, there was a statistical difference in the furcation area when the control subgroup was compared to the sildenafil subgroup, with a lower resorption pattern for the Sildenafil. Likewise, the degree of inflammation showed statistical difference when comparing a furcation area of the control and sildenafil subgroups, with lower inflammation scores for the sildenafil. In the histomorphometric analysis there was a tendency for less reabsorption for the sildenafil subgroup when compared to the placebo, but without statistical significance.

Conclusion: Sildenafil decreased the inflammatory process in the furca as well as bone resorption when used to modulate the progression of EP.

Keywords: Inflammatory reaction; Periodontal Disease; Periodontitis; Sildenafil Citrate

Introdução

O citrato de sildenafila, princípio ativo da marca Viagra®, representou um grande avanço no tratamento da disfunção erétil. Ele atua como um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5. Essa enzima é produzida a partir do óxido nítrico (ON) gerado pelo estimulo sexual e é responsável por degradar o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), fazendo com que o cálcio intracelular presente na musculatura lisa do corpo cavernoso seja mantido, dificultando assim a ereção. O sildenafila atua na manutenção do GMPc, facilitando a degradação do cálcio e, consequentemente, favorecendo a ereção através da via do ON (KARAKOYUN et al., 2011).

Nos últimos anos, estudos avaliaram o uso do sildenafila em diversas doenças além da disfunção erétil. As ações antiinflamatórias benéficas do sildenafila em colite aguda e em modelos de fibrose pulmonar induzida em ratos, foram demonstradas e estão relacionadas à prevenção da peroxidação lipídica, produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos (KARAKOYUN et al, 2011; YILDIRIM et al, 2010). Um outro estudo mostrou que o sildenafila, atuando através de um mecanismo dependente de ON, inibiu gastropatia induzida por indometacina, possivelmente pela redução da adesão e a manutenção de leucócitos no fluxo sanguíneo gástrico (SANTOS et al., 2005). Como observado por Jeong et al. (2009), o citrato de sildenafila preveniu significativamente os danos de lesões inflamatórias renais em ratos diabéticos. Pela sua seletiva e potente inibição da fosfodiesterase 5, o sildenafila inibiu significativamente o estresse oxidativo e a severidade da reação inflamatória no tecido pulmonar de ratos submetidos a queimaduras experimentais (GOKAKIN et al., 2013).

A patogênese da doença periodontal envolve uma interação entre fatores imunológicos e ambientais. Como conseqüência, resulta em uma superprodução de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e oxigênio reativo (OLIVEIRA NOBREGA et al., 2016; WEI et al, 2010). O ON desempenha papel importante na evolução da doença periodontal, principalmente no que diz respeito à degradação dos tecidos. A doença periodontal promove a destruição progressiva dos tecidos periodontais, através de uma resposta inflamatória crônica ao biofilme, induzindo a migração e ativação de células, além da expressão de citocinas e síntese de ON (WEI et al, 2010). O citrato de sildenafila promove um equilíbrio no processo de oxidação e antioxidação, consequentemente reduzindo o estresse oxidativo em

eventos inflamatórios (CADIRCI et al., 2011; KARAKOYUN et al, 2011; AYTEN et al., 2008; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008), como ocorre na doença periodontal.

O tratamento da doença periodontal ainda consiste na eliminação do agente infeccioso utilizando procedimentos de raspagem, profilaxia, e em medidas preventivas como a instrução de higiente oral. Dada à importância da ativação das células inflamatórias envolvidas na progressão da doença periodontal, podendo levar a perda do dente quando não tratada. Assim, há a necessidade de um método adjuvante ao tratamento convencional, com o objetivo de diminuir o processo inflamatório, levando assim a uma menor destruição tecidual. Considerando as evidências que mostram que o citrato de sildenafila inibe significativamente o estresse oxidativo, com redução da severidade do processo inflamatório, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dessa droga na prevenção e na progressão da periodontite induzida em ratos, por meio de uma análise microtomográfica e histológica.

Materiais e métodos

Animais e considerações éticas

O presente trabalho foi aprovado (Processo: 23076.043761/2013-09) pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos e tratamentos realizados nos animais estavam de acordo os Princípios Éticos para Pesquisa Animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Além disso, todo o estudo foi elaborado tendo como base as diretrizes do ARRIVE (KILKENNY et al., 2010).

Foram utilizados 36 ratos (Rattus norvegicus, albinus) machos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300g. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sem restrição de ração e água, sob condições de temperatura ambiente (21-23 ºC) e ciclos de 12h de claro/escuro.

Delineamento do estudo

O estudo foi dividido em dois grupos e cada grupo em três subgrupos. Objetivando avaliar o efeito do sildenafila na prevenção da periodontite experimental, no Grupo 1 (Subgrupos Placebo Prevenção, Controle Prevenção e Sildenafila Prevenção), os animais receberam diariamente doses de sildenafila ou veículo, a partir do 1º dia do estudo até o 30º dia. A periodontite foi induzida no 15º dia e os animais eutanasiados no 30º dia do estudo. No grupo 2 (Subgrupo Placebo Tratamento, Controle Tratamento e Sildenafila Tratamento), objetivou-se analisar o efeito do sildenafila na progressão da periodontite experimental. Iniciou com a indução da periodontite através da ligadura (dia 1) e apenas no 15º dia os animais começaram a receber doses diárias de sildenafila ou veículo até o 30º dia, quando foram eutanasiados (Figura 7).

Cada um dos grupos do estudo foi composto por 18 animais, distribuído em 03 subgrupos de 06 animais. Grupo Placebo Prevenção (PlaPrev) e Grupo Placebo Tratamento (PlaTrat) – Administração diária de veículo por via oral e indução da periodontite. Grupo Controle Prevenção (ControlPrev) e Grupo Controle Tratamento (ControlTrat) – Administração via oral de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente durante todo o estudo, sem periodontite. Grupo Sildenafila Prevenção (SilPrev) e Grupo Sildenafila Tratamento (SilTrat) – Administração via oral de citrato de sildenafila 10mg/kg diariamente durante todo o estudo e indução da periodontite.

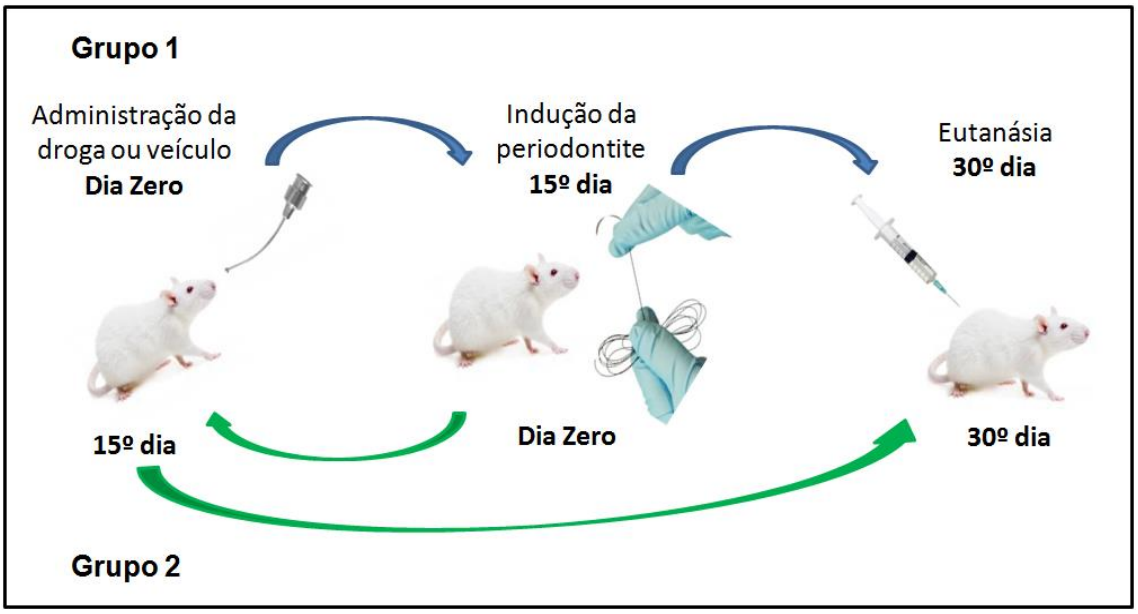

Figura 7. Desenho experimental do primeiro e do segundo grupo do estudo. No grupo 1 (seta azul) a administração do sildenafila ocorreu do dia 0 ao 30º dia. No

grupo 2 (seta verde) iniciou-se com a indução da periodontite (dia 0) e a administração do sildenafila ocorreu a partir do 15º até o 30º dia do estudo.

Indução da periodontite e administração do Citrato de Sildenafila

A periodontite foi induzida por meio da colocação de um fio de sutura de seda estéril número 4.0 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) em volta do primeiro molar inferior esquerdo (BRADLEY et al., 2016; KARAKAN et al., 2017; KOSE et al., 2016). Para isso, os animais foram anestesiados com administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de xylazina (Rompun, Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP. Brasil) por cada 100 g de peso corporal.

O citrato de sildenafila foi obtido a partir da manipulação da matéria bruta, utilizando como veículo um xarope dietético isento de sacarose com baixa viscosidade (composição: água destilada, xantana, citrato de sódio, sorbato de potássio, metilparabeno). A droga foi administrada por gavagem na concentração de 10 mg/kg/dia. A cada 10 dias, novas formulações foram preparadas para evitar a precipitação da droga. A utilização desse veículo para a preparação do fármaco se deu pela característica de pouca solubilidade da droga em água. A apresentação farmacêutica na forma de xarope, além de melhorar a solubilidade do referido fármaco, favorece a sua absorção (BADWAN et al., 2001).

Decorrido o período do estudo, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com cloridrato de quetamina e xilazina. As mandíbulas foram removidas e fixadas com formol tamponado a 10% por 48h.

Análise por microtomografia computadorizada (microTC)

Para exposição das amostras, foi utilizado um tomógrafo de 3ª geração NIKON XT-H 225 ST microfocos (EUA), operando em 80 kV e 222 µA sem filtro e 500ms, utilizando protocolo com tamanho de voxel de 11 microns (µ) e tempo de exposição de 25 minutos.

Após as exposições, as imagens foram reconstruídas utilizando o software XTEK-CT PRO 3D (Nikon, Reino Unido). A área de interesse foi delimitada e em seguida, as reconstruções multiplanares (axial, sagital e coronal) do volume

selecionado foram importadas pelo software VGStudioMax 2.2 (Volume Graphics Gmbh, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, foi aplicado o filtro Gaussiano (3x3x3) para suavizar a presença de artefatos das imagens digitais.

As imagens reconstruídas foram analisadas pelo software ImageJ, versão 14.5 (National Institutes of Health, EUA). Para encontrar a região a ser analisada, o corte axial marcou a região central do dente e o corte sagital foi rotacionado, usando ferramentas do software, até que as raízes estivessem perpendiculares ao solo. As mensurações foram realizadas no corte coronal, onde linhas horizontais foram traçadas: uma na altura da junção amelocementária e outra na parte mais coronal da crista óssea alveolar na raiz mesial e distal. As medidas foram realizadas tanto na face vestibular quanto na lingual. A distância vertical entre as duas linhas horizontais foi capturada em pixel e posteriormente convertidas para milímetros. A extensão da perda óssea na região da furca também foi analisada com três medidas, uma mais próxima da raiz vestibular, outra mais central e a última mais próxima da raiz lingual. As medidas foram tomadas do cemento da furca até o osso alveolar da mesma região (Figura 8).

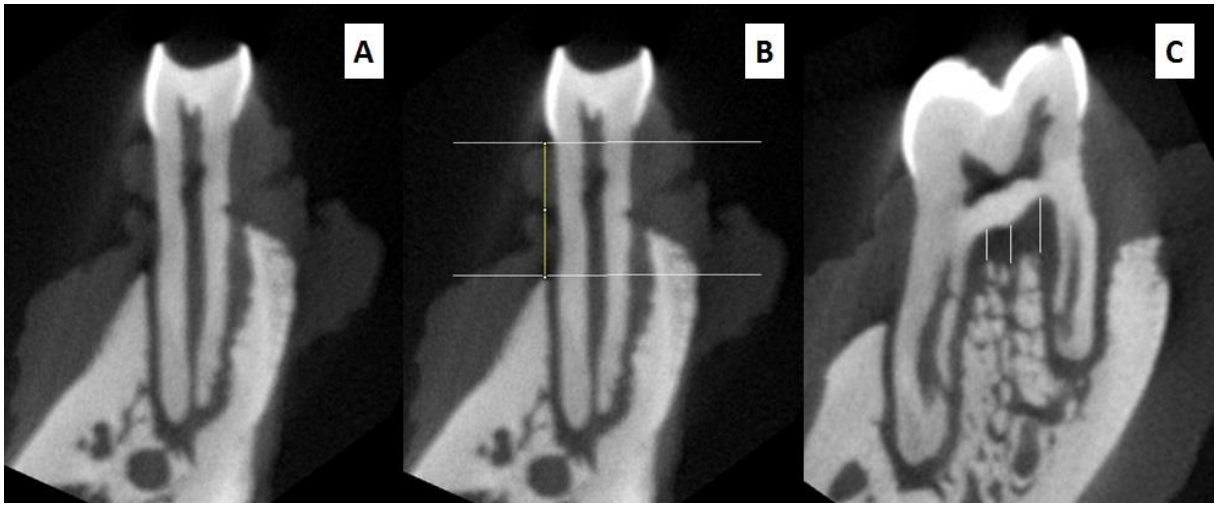

Figura 8. Imagem microtomográfica do primeiro molar inferior. **A-** Vista de um corte coronal da raiz mesial, previamente selecionada em um corte sagital. **B-** Linhas horizontais traçadas na raiz mesial para delimitar a junção amelocementária e a crista óssea alveolar. A linha vertical mede a distância entre as referidas regiões anatômicas na face lingual do elemento dentário. **C-** Linhas verticais traçadas na região de furca entre a raiz vestibular e lingual do primeiro molar inferior, medindo a distância entre o cemento e a crista óssea alveolar da referida região.

Foi realizada uma varredura em todas as amostras, sendo medidos todos os cortes coronais de todos os espécimes, a partir disso, o grau de reabsorção óssea foi mensurado em toda a raiz mesial, distal e na região de furca a partir do corte coronal, mantendo a posição central obtida no corte axial. Os dados extraídos através das medições foram tabulados no software Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, EUA). Foram obtidas médias de reabsorção da face vestibular e lingual tanto para a raiz distal quanto para mesial. Além disso, criou-se a partir de uma média aritmética simples baseada nos dados das faces vestibular e lingual de cada raiz de forma isolada, uma média geral de reabsorção de cada uma das raízes (mesial e distal). Da mesma forma, uma média geral de reabsorção óssea foi conseguida através de uma média aritmética simples baseada na média geral da raiz mesial, distal e na média de reabsorção óssea na área de furca. Seis animais de cada grupo foram avaliados e tiveram todos os cortes microtomográficos mensurados para as três regiões estudadas (furca, raiz dista e mesial).

Análise histológica

Após a obtenção das imagens de microTC, os espécimes foram descalcificados com etilenodiaminotetracetato de tetrasódio (EDTA) a 5% até atingirem ponto de corte e posteriormente submetidos a processamento histológico convencional. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos de tecidos embebidos em parafina e corados em hematoxilina e eosina. A intensidade da reação inflamatória foi avaliada na região de furca, de acordo com os seguintes escores: 1- ausência de inflamação; 2- inflamação leve; 3- inflamação moderada e 4- inflamação intensa. Foi considerada inflamação leve quando poucas células inflamatórias eram encontradas distribuídas focal ou difusamente, moderada quando havia a presença de uma reação inflamatória focal e intensa quando a região avaliada apresentava uma grande quantidade de células inflamatórias distribuídas de forma difusa (BOSCA et al., 2016; CASTRO, KOSS e LÓPEZ, 2014). A análise histológica foi realizada em 72 lâminas, com 4 cortes seriado cada, sendo 36 lâminas de cada grupo e 12 para cada subgrupo estudado.

Análise histomorfométrica

Posteriormente, as lâminas foram digitalizadas pelo escâner Pannoramic MIDI (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Utilizando o software Pannoramic Viewer (Budapest, Hungria), a região de furca foi analisada. O cemento da furca e a crista óssea alveolar da mesma região serviram de referência e 3 medidas foram tomadas, sendo uma mais distal, uma central e outra mais mesial (Figura 9).

Doze lâminas de cada subgrupo, sendo duas de cada animal contendo quatro cortes seriados representativos de toda a área a ser avaliada, foram analisadas. Dessa forma um total de 72 lâminas foram consideradas para a análise histomorfométrica. Todas as medidas de reabsorção óssea foram mensuradas em micrômetros, e posteriormente convertidas para milímetros, a fim de verificar a perda óssea periodontal.

.

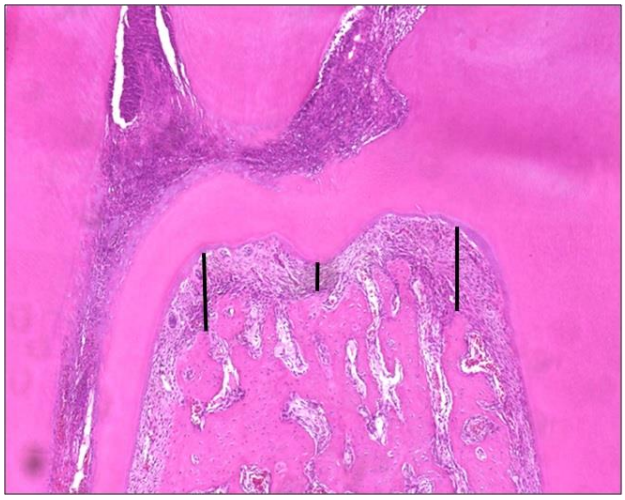

Figura 9. Fotomicrografia das medições histomorfométricas (50x). Três medições na área de furca, sendo uma mais próxima da distal, uma na região central e outra mais próxima a mesial. As medidas foram realizadas tendo como referência o cemento e a crista óssea da região de furca.

Análise estatística

Os valores das medidas obtidas a partir da análise histomorfométrica, imaginológica e dos escores do grau de inflamação, passaram por testes de normalidade (teste de shapiro wilk e Kolmogorov–Smirnov) e posteriormente estatística analítica. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste T para amostras não pareadas. Porém para as que não possuíram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann Whitney. Em ambos os testes foi considerado um nível de significância de 95% ($p<0.05$).

Resultados

Análise por microtomografia computadorizada

No grupo 1 do estudo, a comparação entre o ControlPrev e o SilPrev mostrou que a periodontite experimental foi induzida com sucesso. Entretanto, a droga não foi capaz de prevenir a reabsorção óssea em nenhuma das áreas estudadas quando comparou-se o PlaPrev com o SilPrev. Todas as médias, desvio padrão e valor de *p* para cada grupo e variável estudada estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Médias em milímetros e desvio-padrão da reabsorção óssea das variáveis estudadas por meio de microtomografia computadorizada nos subgrupos do grupo 1 (prevenção) do estudo.

	PlaPrev	**ControlPrev**	**SilPrev**	***p*****		
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	PlaPrev vs. ControlPrev	ControlPrev vs. SilPrev	PlaPrev vs. SilPrev
Média (RM)	1,02 ± 0,13	0,84 ± 0,04	1,17 ± 0,23	**0,024**	**0,017**	0,195
Lingual (RM)	1,12 ± 0,17	1,09 ± 0,05	1,33 ± 0,19	0,680	**0,028**	0,079
Vestibular (RM)	0,91 ± 0,14	0,59 ± 0,05	1,00 ± 0,27	**0,000**	**0,012**	0,472
Furca	0,80 ± 0,83	0,04 ± 0,01	0,55 ± 0,47	**0,057**	**0,048**	0,538
Média (RD)	0,82 ± 0,06	0,59 ± 0,04	0,86 ± 0,12	**0,000**	**0,002**	0,442
Língual (RD)	0,93 ± 0,09	0,82 ± 0,07	1,10 ± 0,17	**0,043**	**0,004**	0,069
Vestibular (RD)	0,70 ± 0,11	0,37 ± 0,04	0,63 ± 0,12	**0,000**	**0,002**	0,321
***MGR**	0,82 ± 0,19	0,58 ± 0,02	0,90 ± 0,15	**0,013**	**0,004**	0,505

RM- Raiz mesial; RD- Raiz distal
*MGR- Média geral da reabsorção
** Teste T para amostras independentes

Quando a droga foi administrata na presença da doença (grupo 2), observou-se uma maior média geral de reabsorção óssea para o subgrupo que recebeu placebo. A droga conseguiu controlar de forma significativa a reabsorção óssea na região de furca quando se comparou o subgrupo tratado com veículo (PlaTrat) com o subgrupo que recebeu administração diária de sildenafila (SilTrat) (p=0,050). No grupo 2 a periodontite também foi induzida com sucesso em todas as áreas avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Médias em milímetros e desvio-padrão da reabsorção óssea das variáveis estudadas por meio de microtomografia computadorizada, bem como valor de *p* referente a comparação entre os subgrupos do grupo 2 (tratamento) do estudo.

	PlaTrat	ControlTrat	SilTrat	*p***		
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	PlaTrat vs. ControlTrat	ControlTrat vs. SilTrat	PlaTrat vs. SilTrat
Média (RM)	1,20 ± 0,12	0,79 ± 0,10	1,16 ± 0,17	**0,000**	**0,001**	0,641
Lingual (RM)	1,37 ± 0,20	1,07 ± 0,13	1,31 ± 0,16	**0,013**	**0,022**	0,582
Vestibular (RM)	0,98 ± 0,15	0,50 ± 0,11	1,01 ± 0,18	**0,000**	**0,000**	0,746
Furca	0,99 ± 0,40	0,10 ± 0,02	0,53 ± 0,25	**0,003**	**0,018**	**0,050**
Média (RD)	0,91 ± 0,10	0,49 ± 0,09	0,87 ± 0,08	**0,000**	**0,000**	0,560
Língual (RD)	1,14 ± 0,09	0,71 ± 0,09	1,01 ± 0,13	**0,000**	**0,001**	0,101
Vestibular (RD)	0,68 ± 0,24	0,26 ± 0,11	0,73 ± 0,12	**0,004**	**0,000**	0,644
***MGR**	0,98 ± 0,12	0,56 ± 0,07	0,95 ± 0,12	**0,000**	**0,000**	0,644

RM- Raiz mesial; RD- Raiz distal
*MGR- Média geral da reabsorção
** Teste T para amostras independentes

Análise histológica

No grupo 1 do estudo, os subgrupos tratados com placebo e com citrato de sildenafila apresentaram grau de inflamação moderado na região avaliada. Já no subgrupo controle, o processo inflamatório estava ausente na região de furca. Não foi verificada diferença significativa quando se comparou o subgrupo placebo com o sildenafila em relação ao grau de inflamação na região de furca (p=0,541) (Tabela 3).

No grupo 2, houve a formação de microabscessos e áreas de osso necrótico na região de furca na maioria dos espécimes do subgrupo placebo, com presença de inflamação intensa (Figura 10). No subgrupo controle, mais uma vez, não foi verificado processo inflamatório na maioria dos espécimes e o subgrupo tratado com citrato de sildenafila mostrou um processo inflamatório de leve a moderado na região analisada. Houve diferença significativa quando se comparou a intensidade da reação inflamatória na área de furca dos subgrupos placebo e sildenafila (p=0,011), com uma menor intensidade inflamatória para o que recebeu a droga (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos escores do grau de inflamação da área de furca nos grupos 1 e 2 do estudo.

	Placebo	Controle	Sildenafila	*p**		
FURCA	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Placebo vs. Controle	Controle vs. Sildenafila	Placebo vs. Sildenafila

Grupo 1 (Prevenção)	2,25 ± 0,50	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	**0,015**	**0,000**	0,541
Grupo 2 (Progressão)	3,80 ± 0,44	1,00 ± 0,00	2,00 ± 1,00	**0,000**	0,225	**0,011**

*Teste de Mann Whitney

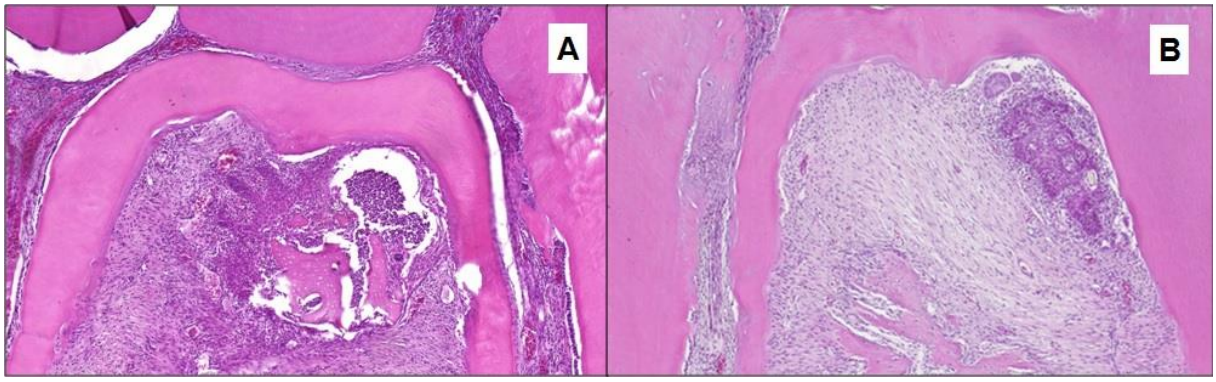

Figura 10. Fotomicrografias mostrando o processo inflamatório na região de furca no grupo 2 do estudo. **A-** Reação inflamatória intensa com presença de microabscesso e área de osso necrótico na área de furca do subgrupo que recebeu placebo (hematoxilina-eosina, aumento original, 100x). **B-** Reação inflamatória de intensidade moderada na região de furca do subgrupo tratado com sildenafila (hematoxilina-eosina, aumento original, 100x).

Análise histomorfométrica

Em ambas as fases do estudo (1 e 2), não foi observada diferença significativa entre as médias de reabsorção óssea dos subgrupos placebo e sildenafila. Entretanto, no grupo 2 do estudo, houve um menor grau de reabsorção no subgrupo tratado com sildenafila quando comparado ao subgrupo placebo (Tabela 4).

Tabela 4. Médias histomorfométricas (milímetros) da reabsorção óssea na área de furca dos grupos 1 e 2 do estudo.

	Placebo	**Controle**	**Sildenafila**	***p****		
FURCA	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Placebo vs. Controle	Controle vs. Sildenafila	Placebo vs. Sildenafila

Grupo 1 (Prevenção)	0,272 ± 0,71	0,087 ± 0,024	0,277 ± 0,085	**0,000**	**0,000**	0,870
Grupo 2 (Progressão)	0,631 ± 0,306	0,101 ± 0,027	0,459 ± 0,216	**0,000**	**0,000**	0,116

* Teste de Mann Whitney

As figuras 11 e 12 mostram a correlação histológica e microtomográfica dos grupos 1 e 2 do estudo, respectivamente.

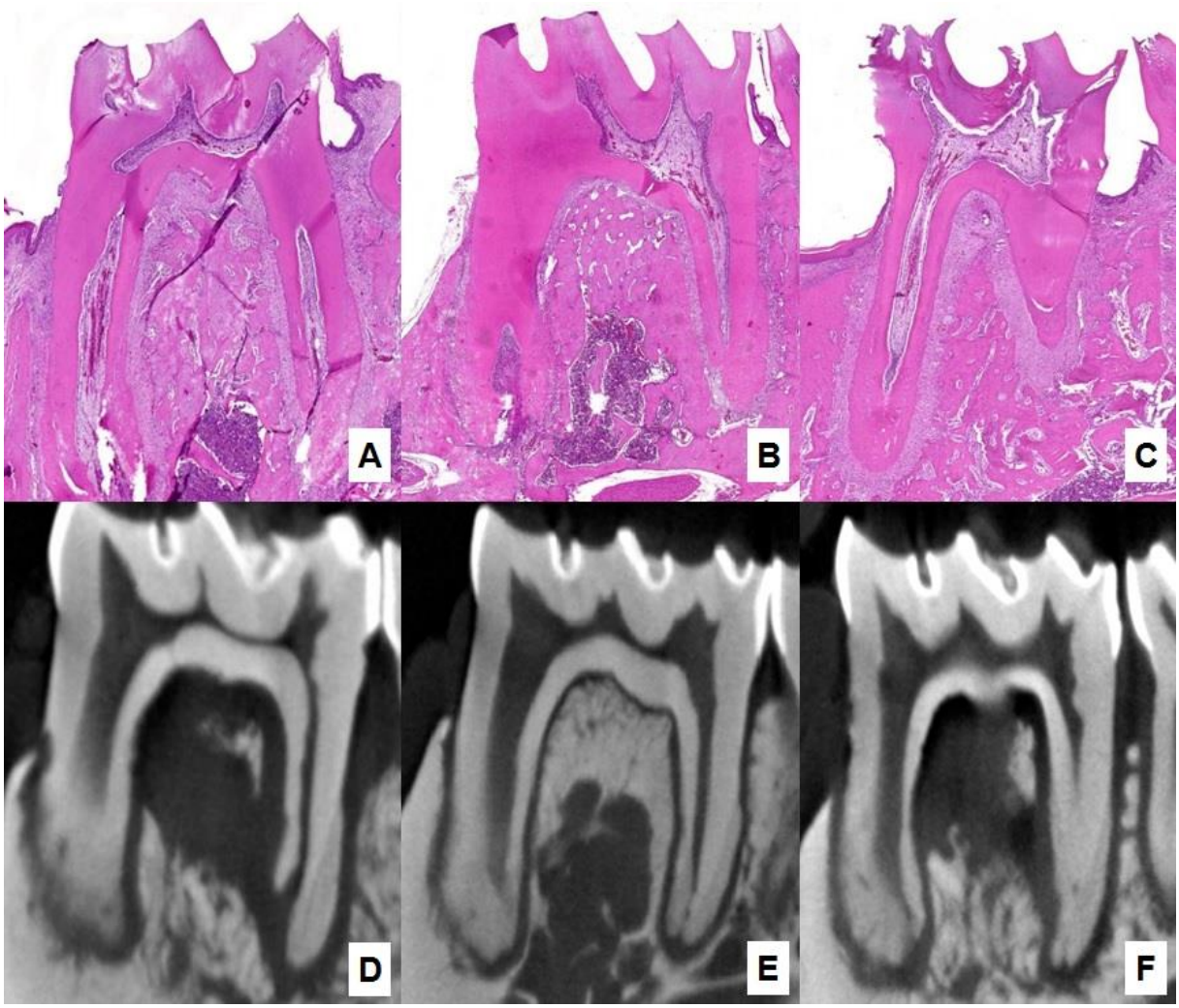

Figura 11. Correlação histológica e microtomográfica do primeiro molar inferior no grupo 1 do estudo. **A, B, C-** Fotomicrografias do primeiro molar inferior dos subgrupos PlaPrev, ControlPrev e SilPrev, respectivamente. Em A e C pode-se observar um padrão de reabsorção óssea semelhante, principalmente na região de furca. Em B a altura do osso alveolar apresenta-se preservada (hematoxilina-eosina, aumento original, 20X). **D, E e F-** Imagens microtomográficas vistas em corte sagital do primeiro molar inferior dos subgrupos PlaPrev, ControlPrev e SilPrev,

respectivamente. Em D e F pode-se observar uma reabsorção óssea principalmente na região de furca, a qual não é verificada em E.

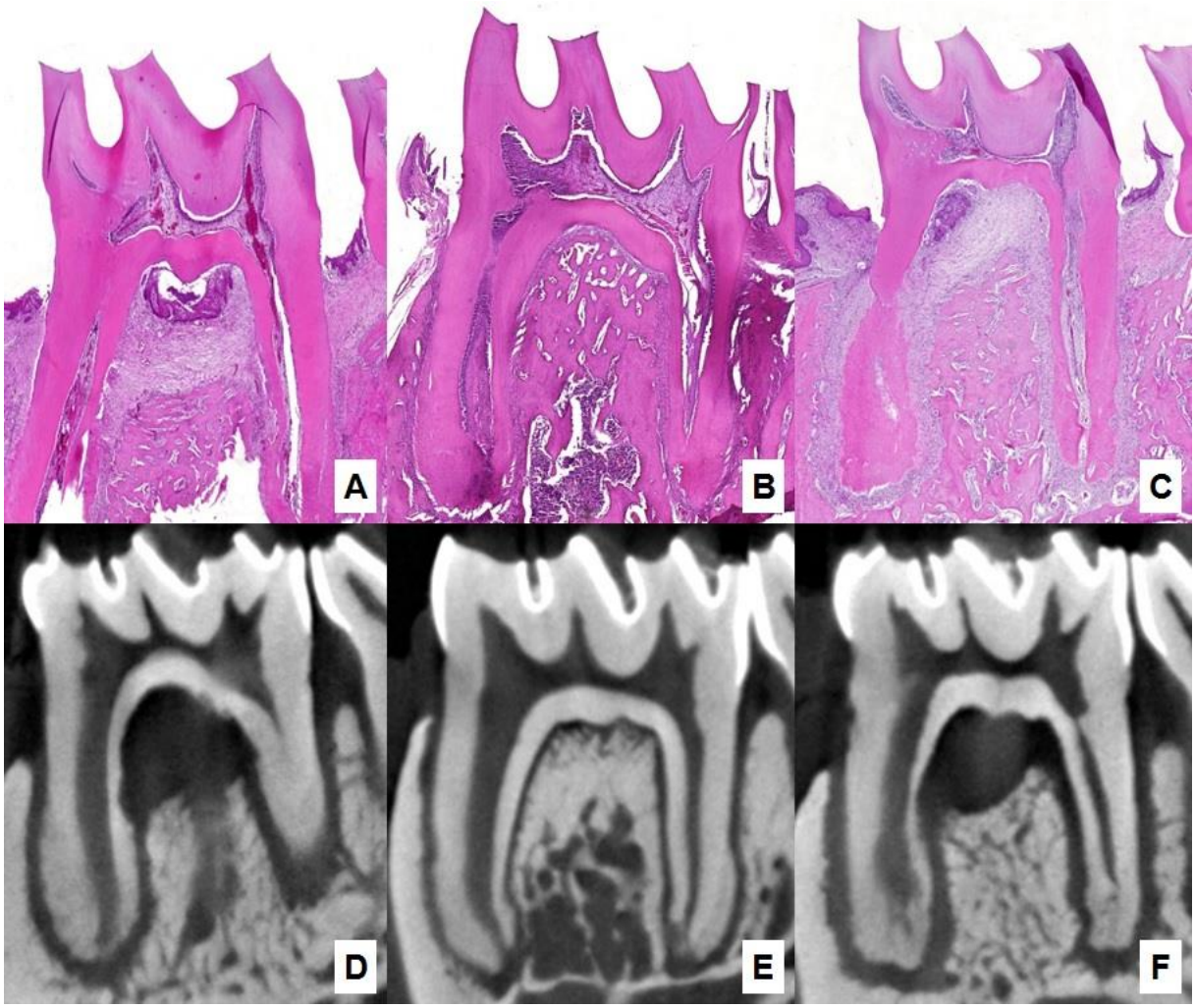

Figura 12. Correlação histológica e microtomográfica do primeiro molar inferior no grupo 2 do estudo. **A, B e C-** Fotomicrografias do primeiro molar inferior dos subgrupos PlaTrat, ControlTrat e SilTrat, respectivamente (hematoxilina-eosina, aumento original, 20X). Em A pode-se observar uma intensa reabsorção óssea acompanhada da formação de microabscessos na região de furca. A imagem C também apresenta uma reabsorção óssea intensa, com um menor grau de inflamação quando comparado à figura 11A. **D, E e F-** Imagens microtomográficas vistas em corte sagital do primeiro molar inferior dos subgrupos PlaTrat, ControlTrat e SilTrat, respectivamente. Em D e F pode-se observar uma reabsorção óssea principalmente na região de furca que não é verificada em E.

Discussão

A raspagem e o alisamento radicular é considerada a modalidade terapêutica convencional e eficaz para o tratamento da periodontite. Entretanto, tratamentos adjuvantes usualmente são necessários pela limitação de acesso a áreas de furca, concavidades, sulcos, sítios distais de molares e bolsas profundas encontradas durante a terapia periodontal convencional. Considerando as evidências que mostram que o citrato de sildenafila inibe significativamente o estresse oxidativo (AYTEN et al., 2008; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008; KARAKOYUN et al, 2011), com redução da severidade do processo inflamatório (CADIRCI et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013), justificou-se avaliar os efeitos dessa droga na evolução da periodontite induzida em ratos, a fim de se ter uma terapia adjuvante ao tratamento convencional.

Este estudo avaliou, de forma pioneira, o efeito do citrato de sildenafila em uma doença inflamatória bucal. Verificou-se uma reação inflamatória significativamente mais leve, bem como uma menor perda de osso alveolar na região de furca quando a droga foi administrada depois da indução da periodontite experimental. Por outro lado, quando o citrato de sildenafila foi administrado antes da indução da doença periodontal, a intensidade da reação inflamatória não se mostrou diferente entre os subgrupos. Esses achados sugerem que o citrato de sildenafila tem potencial para ser usado como um agente adjuvante na progressão da periodontite, mas não como um agente preventivo da doença. A ausência de microabscessos no subgrupo tratado com o medicamento reforça a sua ação anti-inflamatória, também verificada em outros estudos (KARAKOYUN et al, 2011; YILDIRIM et al, 2010).

O óxido nítrico é sintetizado na doença periodontal e participa diretamente da sua patogênese. Ele é produzido e liberado predominantemente por neutrófilos e macrófagos, bem como fibroblastos e células endoteliais (ÖZDEMIR et al., 2015). Este fato sugere que a sua produção ocorra em resposta aos patógenos e aos agentes inflamatórios presentes na doença. O citrato de sildenafila contribui para o tratamento dos distúrbios de ereção pela via do óxido nítrico (KRENZELOK, 2000). Nesta investigação, observou-se um menor processo inflamatório na região de furca para o subgrupo que recebeu doses de 10 mg/kg/dia de sildenafila. Como os neutrófilos são as células mais predominantes nos estágios iniciais da inflamação e que o fármaco investigado diminui o número de neutrófilos, grau de inflamação e produção de citocinas (KARAKOYUN et al, 2011; YILDIRIM et al, 2010), o mesmo

apresenta indícios de uma possível indicação, talvez associado a terapia periodontal básica, para diminuir o processo inflamatório presente na doença periodontal. Além disso, o citrato de sildenafila poderia, eventualmente, ser útil no tratatmento de outras doenças inflamatórias bucais como, por exemplo, mucosites orais, visto que o componente inflamatório é bastante predominate nesta enfermidade, além do aumento do estresse oxidativo e de radicais livres (SONIS, 2013). Eventos estes que foram atenuados pelo sildenafila em estudos anteriores (AYTEN et al., 2008; HEMNES, ZAIMAN e CHAMPION, 2008)

A diminuição do número de neutrófilos e consequentemente a intensidade da inflamação pode ser explicada pelo fato do sildenafila causar uma menor aderência leucocitária. Este fato foi verificado no estudo de Santos et al., 2005, o qual demonstrou, a partir de análise microscópica, uma menor aderência leucocitária induzida por indometacina em mucosa gastrica de ratos. Um outro estudo demonstrou uma redução no infiltrato de leucócitos $CD3^+$ em tecido nervoso (PIFARRE et al., 2011). Investigando o efeito do sildenafila na esclerose multipla, Nunes et al., (2012) observaram uma redução de IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2 e COX-2 no tecido cerebral do grupo tratado com o medicamento. É sabido que tanto a presença de neutrófilos e citocinas como TNF-α, COX-2 e interleucinas desempanham papel importante na inflamação e na destruição dos tecidos periodontais (ARAÚJO et al., 2013), este fato gera subsídios para investigações da modulação das referidas citocinas pelo citrato de sildenafila na periodontite.

Estudos anteriores, utilizando doses iguais a testada neste trabalho (10 mg/kg/dia), obtiveram resultados satisfatórios no que diz respeito a cicatrização de feridas, neovascularização (DERICI et al., 2010), diminuição do estresse oxidativo e processo inflamatório (CADIRCI et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013), diminuição do fator de necrose tumoral (CADIRCI et al., 2011) e aumento da formação de tecido ósseo em regiões de fratura (HISTING et al., 2011). Estes resultados serviram de base para a escolha da dose a ser testada. Alem disso, Gokakin et al. (2013) compararam doses de 10 e 20 mg/kg/dia de citrato de sildenafila em lesões pulmonares agudas de ratos induzidas por queimaduras graves. Os achados revelaram que o sildenafila aumentou a atividade da glutationa peroxidase, catalase, capacidade antioxidante total, diminuiu o estresse oxidativo e os escores de inflamação nos pulmões. Sugere-se assim que o medicamento protege contra a inflamação e o estresse oxidativo e que a dose 10 mg/kg/dia parece ser

aparentemente superior à de 20 mg/kg/dia para o tratamento da condição estudada. Ainda de acordo com os mesmos autores, a administração de 10 mg/kg/dia de sildenafila resultaria aproximadamente na mesma concentração plasmática de 50 mg utilizada regularmente em humanos para tratamento da disfunção erétil.

Em outras doenças, resultados favoráveis foram observados quando doses maiores que 10 mg/kg/dia de citrato de sildenafila foram utilizadas. Doses de 20 mg/kg/dia tiveram importante efeito protetor na sepse induzida por ligadura e punção cecal em ratos (CADIRCI et al., 2011), enquanto 25 mg/kg/dia foi eficiente para o tratamento de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos. Houve diminuição da formação de placas de ateroma em ratos tratados com 40 mg/kg/dia de sildenafila (LEAL et al., 2015). Em contrapartida, 5 mg/kg/dia de sildenafila foi efetivo para acelerar signficativamente a cicatrização inicial de fratura fechada de fêmur em ratos (HISTING et al. 2011). Estes achados justificam a escolha da dose utilizada no presente estudo, onde foi verificado um menor processo inflamatório e uma manutenção da altura da crista óssea alveolar com uma dose de 10 mg/kg/dia. Além disso, doses maiores podem aumentar o risco de efeitos colaterais, os quais quase sempre estão ligados ao efeito vasodilatador do fármaco, como cefaléia, congestão nasal, visão anormal, bradicardia, rubor, dispneia. Em geral, os efeitos colaterais relatados são transitórios e de gravidade que pode variar entre leve à moderada (LIM et al., 2002; PADMA-NATHAN et al., 2006).

Apesar da ação anti-inflamatória importante observada em outros estudos e a diminuição significativa da inflamação na região de furca no grupo 2 deste experimento, a utilização do citrato de sildenafila não impediu a perda óssea causada pela periodontite experimental quando a droga foi administrada previamente à indução da doença periodontal. Além dos diferentes agentes etiológicos das doenças inflamatórias anteriormente estudadas, a doença periodontal, apesar de ser uma doença primariamente inflamatória, apresenta patogênese complexa. Há presença de uma comunidade microbiana complexa e dinâmica formando um biofilme polimicrobiano com a presença de microorganismos com graus de patogenicidade distintos. Além disso, associa-se a modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro. Tudo isso faz com que a destruição dos tecidos periodontais de suportes seja dependente de outros fatores além do processo inflamatório (NG et al., 2016). Este fato pode ter sido determinante para a não obtenção de resultados significativos quanto ao controle da perda óssea

alveolar no primeiro grupo deste etudo. Como já foi verificado em trabalhos anteriores, a droga atua como moduladora da resposta inflamatória (CADIRCIi et al., 2011; GOKAKIN et al., 2013) e baseados nos achados deste estudo, a sensibilização prévia ao referido fármaco não preveniu a instalação da periodontite. Assim, somente o uso de um agente anti-inflamatório não seria suficiente para conter a evolução da doença.

A avaliação da área de furca em estudos experimentais é bem estabelecida na literatura. Outros autores que utilizaram a ligadura como forma de indução da periodontite em ratos também optaram pela mensuração, histológica e imaginológica, apenas da região de furca, por ser uma área com um maior volume tecidual, deixando assim a análise mais expressiva (BRANCO DE ALMEIDA et al., 2012; FEITOSA et al., 2009). Neste estudo, a reabsorção óssea por histomorfometria e a intensidade da reação inflamatória das áreas interproximais não foram mensuradas, devido à pequena quantidade de tecido nestas regiões, dificultando a avaliação. Este fato pode ser justificado pela espessura mais delgada das cristas ósseas interproximais, associada ao intenso processo de reabsorção à que os espécimes foram submetidos, fazendo com que ocorresse perda de material durante o processamento histológico e descalcificação das amostras.

A não confirmação dos resultados encontrados a partir de métodos distintos de análise (microCT e histomorfometria) no grupo 2 do estudo, pode estar relacionada aos vários passos e a dificuldade do processamento histológico, com perda de tecido decorrentes da descalcificação. Em contrapartida os resultados não foram contraditórios, as análises apresentaram uma tendência similar de resultados, apenas não sendo significativos em todas os métodos de utilizados. A microCT mostra-se como um método fidedigno de análise, podendo o espécimse ser avaliado em três dimensões. Embora não seja adequada para uso clínico, ela fornece informações mais detalhadas sobre pequenas estruturas anatômicas quando comparada com a tomografia computadorizada de feixe cônico (ARCAR et al., 2015).

Conclusão

O citrato de sildenafila reduziu o processo inflamatório, bem como diminuiu a perda óssea alveolar na periodontite experimental em ratos. Esse achado mostra que a droga tem potencial para ser utilizada como tratamento adjuvante da doença

periodontal, além do tratamento de outras doenças inflamatórias bucais. Mais estudos são necessários para avaliar a associação deste medicamento com a terapia periodontal básica, além de outros modelos animais para avaliar o seu uso em outras condições inflamatórias bucais.

Referências

Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, Alican I (2011). The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci*; **89:** 402-07.

Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, *et al* (2010). Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*; **23:** 215–21.

Santos CL, Souza MHLP, Gomes AS, Lemos HP, Santos AA, Cunha FQ, *et al* (2005). Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol*; **146:** 481–6.

Jeong K-H, Lee T-W, Ihm C-G, Lee S-H, Moon J-Y, Lim S-J (2009). Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozocin-induced diabetic rats. *Am J Nephrol*; **29:** 274–82.

Gokakin AK, Deveci K, Kurt A, Karakus BC, Duger C, Tuzcu M Topcu O (2013). The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. *Burns*; **39:** 1193-9.

Oliveira Nobrega FJ, Oliveira DH, Vasconcelos RG, Nonaka CF, Queiroz LM (2016). Study of the participation of MMP-7, EMMPRIN and cyclophilin A in the pathogenesis of periodontal disease. *Arch Oral Biol*; **72:** 172-78.

Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G (2010). Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*; **55:** 70-8.

Cadirci E, Halici Z, Odabasoglu F, Albayrak A, Karakus E, Unal D, *et al* (2011). Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. *Clin Exp Immunol*; **166:** 374–84.

Ayten R, Cetinkaya Z, Girgin M, Ozercan I, Ustundag B, Aygen E (2008). The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. *Dis Colon Rectum*; **51:** 1837–41.

Hemnes AR, Zaiman A, Champion HC (2008). PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; **294:** 24–33.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol;* **8:** 1-5.

Bradley AD, Zhang Y, Jia Z, Zhao G, Wang X, Pranke L, Schmid MJ, Wang D, Reinhardt RA (2016). Effect of simvastatin prodrug on experimental periodontitis. *J Periodontol*; **87:** 577-82.

Karakan NC, Akpinar A, Goze F, Poyraz Ö (2016). Investigation the effects of systemically administered strontium ranelate on alveolar bone loss histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*; DOI:10.1902/jop.2016.160227. [Euro ahead of print] PubMed PMID: 27615270.

Kose O, Arabaci T, Yemenoglu H, Kara A, Ozkanlar S, Kayis S, Duymus ZY (2016). Influences of fucoxanthin on alveolar bone resoorption in induced periodontitis in rat molars. *Mar Drugs*; **14:** 1-11.

Badwan, Adnan A.; Nabulsi, Lina; Al-Omari, Mahmoud M.; Daraghmeh, Nidal; Ashour, Mahmoud (2001). Sildenafil citrate In: Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Elsevier Inc., USA; **27:** 339-376.

Bosca AB, Miclãus V, Ilea A, Câmpian RS, Rus V, Ruxanda F, Ratiu C, Uifãlean A, Pârvu AE (2016). Role of nitro-oxidative stress in the pathogenesis of experimental rat periodontits. *Clujul Med*; **89:** 150-59.

Castro CE, Koss MA e López ME (2014). Cytological analysis of the periodontal pocket in patients with aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Contemp Clin Dent*; **5:** 495-00.

Derici H, Kamer E, Ünalp HR, Diniz G, Bozdag AD, Tansug T, Ortac R, Erbil Y (2010). Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbecks Arch Surg*; **395:** 713–718.

Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res*; **29:** 867-73.

Almansour M, Jarrar Y, Jarrar B (2016). Propolis protective role against morphological, hormonal biochemical and histological alterations induced by sildenafil overdoses. *Int J Morphol*; **34:** 553-40.

Sharma NR, Sharma S, Ahmad J, Nadkarni N, Rana S, Kalhan S (2016). Sildenafil: A rare cause of erythema multiforme. *Indian J Sex Transm Dis*; **37:** 85-7.

Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC (2016). Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microb Pathog*; **94:** 60-9.

Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC (2015). Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse modelo of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. *Curr Pharm Biotechnol*; **16:** 517-30.

Branco de Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC *et al* (2012). Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat modelo f ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*; **83:** 664-71.

Özdemir B, Özmeric N, Elgün S, Baris E (2016). Smoking and gingivitis: focus on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide and basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*; **51:** 596-03.

Krenzelok EP (2000). Sildenafil: clinical toxicology profile. *J Toxicol Clin Toxicol*; **38:** 645-51.

Sonis ST (2013). Oral mucositis in head and neck câncer: risk, biology, and management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. **236:** 40-2

Santos CL, Souza MHLP, Gomes AS, Lemos HP, Santos AA, Cunha FQ, *et al* (2005). Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol*; **146:** 481–6.

Pifarré P, Prado J, Baltrons MA, Giralt M, Gabarro P, Feinstein DL, et al (2011). Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*; **121:** 499–08.

Nunes AKS, Rapôso C, Luna RLA, Cruz-Höfling MA, Peixoto CA (2012). Sildenafil (Viagra®) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. *Cytokine*; **60:** 540-51.

Araújo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GAC, Aragão KS, Araújo LS, Medeiros CAX, Alves MSCF, Araújo Jr RF (2013). Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-α, down-regulated COX-2, MMP-W, MMP-9 and RANKL/RANK in na experimetal periodontitis model. *J Clin Periodontol*; **40:** 1104-11.

Lim PHC, Li MK, Ng FC, Chia SJ, Consigliere D, Gooren L et al (2002). Clinical effecacy and safety of sildenafil citrate (Viagra) in a multi-racial population in Singapore: A retrospective study of 1520 patients. *Int J Urol*; **9:** 308-15.

Padma-Nathan H (2006). Sildenafil citrate (Viagra) treatment for erectile dysfunction: an updated profile of response and effectiveness. *Int J Impot Rest*; **18:** 423-31.

Feitosa DS, Marques MR, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH, Toledo S (2009). The influence of thyroid hormones on periodontitis related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: a histological study in rats. *J Periodontol Res*; **44:** 472-78.

Arcar B, Kamburoglu K, Tatar I, Arikan V, Çelik HH, Yuksel S, Özen T (2015). Comparison of micro-computerized tomography and cone-beam computerized tomography in the detection of accessory canals in primary molars. *Imaging Sci Dent*; **45:** 205-11.

7 CONCLUSÃO

O citrato de sildenafila administrado em doses diárias de 10 mg/kg reduziu o processo inflamatório, bem como diminuiu a perda óssea alveolar da periodontite experimental na região de furca. Esse achado mostra que ele tem potencial para ser utilizado como um tratamento adjuvante da doença periodontal, além do tratamento de outras doenças inflamatórias bucais. Estudos adicionais, utilizando outras dosagens ou avaliando sua ação combinada a tratamentos convencionais, devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. C. A. et al. Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. **J Periodont Res**, v. 48, n. 5, p. 632-637, 2013.

AKRAM, Z. et al. Effect of photodynamic therapy and laser alone as adjunct to scaling and root planning on gingival crevicular fluid inflammatory proteins in periodontal disease: A systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 16, n. 1, p. 30144-30152, 2016.

ALI, B. H. et al. The effect of sildenafil on cisplatin nephrotoxicity in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v, 109, n. 4, p. 300-308, 2011.

ARAÚJO, A. A. et al. Effect telmisartan on levels of IL-1, TNF- α, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 12, p. 1104-1111, 2013.

ARAÚJO JÚNIOR, R. F. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 75322-75329, 2013.

AYTEN, R. et al. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. **Dis Colon Rectum**, v. 51, n. 12, p. 1837-1841, 2008.

BADWAN, A. A. et al. **Sildenafil citrate In: Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients**. Elsevier Inc., USA; 2001.

BOSCA, A. B. et al. Role of nitro-oxidative stress in the pathogenesis of experimental rat periodontits. **Clujul Med**, v. 89, n. 1, p. 150-159, 2016.

BRANCO DE ALMEIDA, L. S. et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat modelo f ligature-induced periodontitis. **J Periodontol**, v. 83, n. 5, p. 664-671, 2012.

BRADLEY, A. D. et al. Effect of simvastatin prodrug on experimental periodontitis. **J Periodontol**, v. 87, n. 5, p. 577-582, 2016.

CADIRCI, E. et al. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. **Clin Exp Immunol**, v. 166, n. 3, p. 374-384, 2011.

CASTRO, C. E.; KOSS, M. A.; LÓPEZ, M. E. Cytological analysis of the periodontal pocket in patients with aggressive periodontitis and chronic periodontitis. **Contemp Clin Dent**, v. 5, n. 4, p. 495-500, 2014.

CAKMAK, E. et al. Effect of sildenafil citrate on secondary healing in full thickness skin defects in experiment. **Bratisl Lek Listy**, v. 115, n. 5, p. 267-271, 2014.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CORRÊA, M. G. et al. Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v. 52, n. 2, p. 201-209, 2017.

DERICI, H. et al. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. **Langenbecks Arch Surg**, v. 395, n. 6, p. 713-718, 2010.

DUFFIN, R.; SHAW, C. A.; ROSSI, A. G. Sildenafil reduces alcohol-induced gastric damage: just say 'NO'. **Brit J Pharmacol**, v. 153, n. 4, p. 623-624, 2008.

FEITOSA, D. S. et al. The influence of thyroid hormones on periodontitis related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: a histological study in rats. **J Periodontol Res**, v. 44, n. 4, p. 472-478, 2009.

GOKAKIN, A. K. et al. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 193-1999, 2013.

GULLU, C. et al. Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 2, p. 168-175, 2005.

HEMNES, A. R.; ZAIMAN, A.; CHAMPION, H. C. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 1, p. 24-33, 2008.

HISTING, T. et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. **J Orthop Res**, v. 29, n. 6, p. 867-873, 2011.

ISERI, S. O. et al. The effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. **J Gastroenterol Hepatol**, n. 24, n. 6, p. 1440-1448, 2009.

JEONG, K. H. et al. Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozocin-induced diabetic rats. **Am J Nephrol**, v. 29, n. 3, p. 274-282, 2009.

JIANG, H. et al. Prevalence and risk factors of periodontal disease among pre-conception Chinese women. **Reprod Health**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2016.

KARAKAN, N. C. et al. Investigation the effects of systemically administered strontium ranelate on alveolar bone loss histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 88, n. 2, p. 24-31, 2017.

KARAKOYUN, B. et al. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. **Life Sci**, v. 89, n. 11, p. 402-407, 2011.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KOSE, O. et al. Influences of fucoxanthin on alveolar bone resoorption in induced periodontitis in rat molars. **Mar Drugs**, v. 14, n. 4, p. 1-11, 2016.

LIN, G. et al. Prominent expression of phosphodiesterase 5 in striated muscle of the rat urethra and levator ani. **J Urol**, v. 184, n. 2, p. 769-774, 2010.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontologia Clínica e Implantologia Oral**. 5ªed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

MATSUBARA, V. H. et al. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 14, n. 7, p. 643-655, 2016.

MESSORA, M. R. et al. Favourable effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats. **Arch Oral Biol**, v. 66, n. 1, p. 108-119, 2016.

NG, H. M. et al. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. **Microb Pathog**, v. 94, n. 1, p. 60-69, 2016.

ÖZDEMIR, B. et al. Smoking and gingivitis: focus on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide and basic fibroblast growth factor. **J Periodontal Res**, v. 51, n. 5, p. 596-603, 2016.

SANTOS, C. L. et al. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br J Pharmacol**, v. 146, n. 4, p. 481-484, 2005.

SOUSA, L. H. et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Periodontol**, v. 87, n. 10, p. 1206-1216, 2016.

WEI, D. et al. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. **Aust Dent J**, v. 55, n. 1, p. 70-78, 2010.

YILDIRIM, A. et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 23, n. 3, p. 215-221, 2010.

ANEXO – Parecer do comitê de ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 26 de novembro de 2013.

Ofício nº 652/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Danyel Elias da Cruz Perez**
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Clínica e Odontologia preventica/ Patologia Oral
Processo nº 23076.043761/2013-09

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***"Efeito do citrato de sildenafil na progressão da doença periodontal experimental em ratos ".***

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Morfologia. Animal: Rato heterogênico; Linhagem: Wistar; Idade: 3 meses; Peso: 250-300g; Sexo: machos; Nº Total de Animais: 60.

Atenciosamente

Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924