

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO USO DE UM ANTAGONISTA BETA2-  
ADRENÉRGICO EM UM MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL  
EXPERIMENTAL**

**UBERABA - MG**

**2011**

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO USO DE UM ANTOGONISTA BETA2-  
ADRENÉRGICO EM UM MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL  
EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão para fins de exigência do programa de Mestrado Acadêmico em Odontologia com ênfase em Biopatologia da Universidade de Uberaba – UNIUBE.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga

**UBERABA - MG**

**2011**

## AGRADECIMENTOS

Uma dissertação é um trabalho baseado em estudo teórico de natureza reflexiva, que consiste na ordenação de idéias sobre um determinado tema, com uma característica básica de cunho reflexivo-teórico. Contém uma finalidade, sob o ponto de vista acadêmico, ser um trabalho que visa a avaliação individual. No entanto para que a mesma seja desenvolvida existe a necessidade daquilo que se precede o indivíduo, o “grupo”. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos, por contributos de naturezas diversas:

Ao Dr. Marcelo Henrique Napimoga, pela confiança em que me concebeu de participar deste trabalho como seu orientando, e com certeza pela sua dedicação, agilidade e competência nos deveres afins. Pelo companheirismo desde o início do curso, pelos ensinamentos profissionais e de vida e agradeço principalmente por almejar meu sucesso.

Aos colegas Josafá e Cleomar, pela contribuição na indução do modelo experimental;

À Dra. Juliana T. Napimoga e ao Alexandre Lopes seu aluno, pela contribuição da padronização e realização dos procedimentos de quantificação de proteínas “*in vivo*”.

Aos Drs. Valdo e Octávio, pela contribuição na parte da avaliação hemodinâmica;

À Dra. Tarcília Aparecida da Silva e a Prof. Mila Fernandes Moreira Madeira, pela contribuição na avaliação “*in vitro*”;

A todos aqueles que de certa forma nos auxiliou nos procedimentos e na realização deste trabalho;

Aos professores do curso, aos quais contribuíram com meu aprendizado;

Aos professores que aceitaram participar do processo de avaliação desta dissertação, sendo, Dr. Geraldo Thedei, Dr. Javier E.Lazo Chica, Dra. Ruchele Nogueira D. Geraldo Martins e ao Dr. Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa;

A toda minha família, em especial meus pais e irmãos, pelo apoio;

À minha namorada Camila, pelo apoio, força, companheirismo e compreensão com minhas atividades. Principalmente pela sua presença em minha vida, a qual é essencial em todos os sentidos.

Sem me esquecer, meus sinceros agradecimentos ao mentor e criador de todas as coisas “Deus”, pela oportunidade de poder vivenciar tal situação.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo até esta etapa de vida. Em especial meus pais José Francisco Rodrigues e Manoelina Rodrigues, sempre presentes, e à minha namorada Camila Botelho Miguel, que soube compreender todos os momentos desta caminhada.*

"A aprendizagem se realiza através da conduta ativa do aluno, que aprende mediante o que ele faz e não o que faz o professor".

Ralph W. Tyler.

## RESUMO

Tem sido demonstrado que os ossos de mamíferos são amplamente inervados sugerindo um importante papel da regulação simpática do metabolismo ósseo. O uso de  $\beta$ 2-bloqueadores tem sido associado com diminuição da fragilidade óssea, sugerindo que a remodelação óssea está sob controle  $\beta$ -adrenérgico, embora existam estudos controversos. OBJETIVOS: No presente estudo, testamos o efeito de um  $\beta$ -antagonista (propranolol) na modulação da reabsorção óssea em um modelo de doença periodontal experimental. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Uberaba (# 048/2009). A periodontite experimental foi induzida pela colocação de ligadura ao redor da mandíbula nos primeiros molares de cada animal (ligadura-animais). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) animais sem ligadura que receberam o veículo; 2) animais ligados que receberam veículo; 3) animais ligados que receberam 0,1 mg de propranolol; 4) animais ligados que receberam 5 mg de propranolol e 6) animais ligados que receberam 20 mg de propranolol. Trinta dias após a indução da doença periodontal, a frequência cardíaca, pressão sistólica (PSVE) e a pressão diastólica final (PDFVE), positiva e negativa (LV dP/dt) foram aferidas através de cateterismo cardíaco nos ratos anestesiados. Os tecidos gengivais foram removidos e avaliados quanto à expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , realizadas pelos métodos de ELISA, e ICAM-1 e RANKL por western blot. As mandíbulas foram fixadas e descalcificadas em EDTA e cortado em 6  $\mu$ m, posteriormente seções foram montadas em lâminas e corados com hematoxilina e eosina para avaliação da reabsorção óssea. Além disso, analisamos a capacidade do propranolol (1, 3 e 10 mM) em inibir a osteoclastogênese utilizando a linhagem celular RAW264.7. Os resultados demonstraram que apenas propranolol em 0,1 e 5 mg/kg foram capazes de reduzir estatisticamente a reabsorção óssea, assim como ICAM-1 e a expressão de RANKL. No entanto, apenas 0,1 mg/kg reduziu significativamente a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em comparação, com os animais com a ligadura que receberam veículo. Importante, apenas 0,1 mg/kg de propranolol não alterou os parâmetros hemodinâmicos. Em consonância com os resultados obtidos em experimentos *in vivo*, observamos que o propranolol inibe a diferenciação dos

osteoclastos *in vitro* na presença de RANKL, sem afetar a viabilidade celular (azul de Trypan). Esses dados indicam que doses baixas de propranolol podem suprimir a reabsorção óssea através inibição da osteoclastogênese mediada por RANKL, inibindo assim marcadores inflamatórios durante o curso da doença periodontal experimental em ratos sem afetar os parâmetros hemodinâmicos.

**Palavras Chave:** propranolol, doença periodontal, betabloqueador, osso, inflamação.

## ABSTRACT

It has been demonstrated that mammalian bones are widely innervated suggesting an important role of the sympathetic regulation of bone metabolism. The use of  $\beta$ -blockers has been associated with decreasing of bone fragility, suggesting that the bone remodeling is under  $\beta$ -adrenergic control, although there are controversial studies. In the present study, we tested the effect of a  $\beta$ -antagonist (propranolol) in the modulation of bone resorption in an experimental periodontal disease. All animal procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the University of Uberaba (#048/2009). The experimental periodontitis was induced by a ligature placement around mandible first molars of each animal (ligated-animals). Rats were assigned to one of the following groups: 1) animals without ligature receiving vehicle; 2) ligated-animals receiving vehicle; 3) ligated-animals receiving 0.1 mg of propranolol; 4) ligated-animals receiving 5mg of propranolol and 6) ligated-animals receiving 20 mg of propranolol. Thirty days after induction of periodontal disease, heart rate, left ventricular systolic (LVSP) and end-diastolic pressures (LVEDP), and positive and negative LV dP/dt were measured by cardiac catheterization in anesthetized rats. Gingival tissues were removed and assessed for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  quantification by ELISA and ICAM-1 and RANKL expression by western blot. The mandibles were fixed and decalcified in EDTA and sliced into 6 $\mu$ m sections mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin for the evaluation of bone resorption. Also, we analyzed the ability of propranolol (1, 3 and 10  $\mu$ M) to inhibit osteoclastogenesis using the cell line RAW264.7. RESULTS: The results demonstrated that only propranolol at 0.1 and 5 mg/kg were able to reduce statistically the bone resorption as well as ICAM-1 and RANKL expression. However, only 0.1 mg/kg significantly reduced the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in comparison to ligated-animals receiving vehicle. Important, only 0.1 mg/kg of propranolol did not alter all the hemodynamics parameters. Accordingly to such results obtained from *in vivo* experiments, propranolol also suppressed *in vitro* osteoclast differentiation in the presence of RANKL without affect the cell viability (Trypan blue test). These data indicated that low dose of propranolol may suppress the bone resorption by inhibiting

RANKL-mediated osteoclastogenesis as well inflammatory markers elicited during the course of experimental periodontitis in rats without affect hemodynamic parameters.

**Key Words:** propranolol, periodontal disease, beta-blocker, bone, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Parâmetros hemodinâmicos (A) Frequência cardíaca e (B) pressão arterial média. Dados em média  $\pm$  EPM. \* $P < 0.05$  vs sem DP; # $P < 0.05$  vs DP + veículo; & $P < 0.05$  vs 0.1 mg/kg e § $P < 0.05$  vs 5 mg/kg. ....41
- Figura 2** Avaliação cardiovascular da pressão diastólica ventricular final esquerda. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs sem DP; #  $P < 0,05$  vs DP + veículo; &  $P < 0,05$  vs 0,1 mg / kg e §  $P < 0,05$  vs 5 mg / kg. ....43
- Figura 4** Média de valores mínimos de dP/dtmin. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs sem DP; #  $P < 0,05$  vs DP + veículo; &  $P < 0,05$  vs 0,1 mg / kg e §  $P < 0,05$  vs 5 mg / kg. ....44
- Figura 3 Média de valores máximos da dP/dt Max. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs sem DP; #  $P < 0,05$  vs com DP + veículo; e  $P < 0,05$  vs 0,1 mg / kg e §  $P < 0,05$  vs 5 mg / kg. ....44
- Figura 5-** Cortes histológicos de 6 $\mu$ m de espessura corados com H&E. (A) mostra área de reabsorção fisiológica entre o osso alveolar e a coroa dental. (B) área extensa de reabsorção óssea induzida pela doença periodontal. (C) diminuição expressiva da área de reabsorção após tratamento (0,1 mg/Kg) com propranolol. (D) moderada diminuição da reabsorção (tratamento com 5 mg/Kg). E- discreta diminuição da reabsorção após tratamento com 20 mg/Kg de propranolol. ....46
- Figura 6** Comparação dos quanto a área de reabsorção óssea, segundo os grupos,  $p < 0,05$  (ANOVA seguido de Bonferroni). ....47
- Figura 7:** Concentração de IL-1 $\beta$  nos grupos tratados com diferentes concentrações de propranolol após indução da doença periodontal. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. O símbolo # demonstra diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem doença periodontal e o grupo com doença periodontal e tratado com veículo. O símbolo \* indica diferença estatística entre o grupo com doença periodontal e tratado com veículo e os animais com doença periodontal e tratados com propranolol 0,1 mg/kg. (ANOVA seguido de Bonferroni). ....48
- Figura 8:** Concentração de TNF- $\alpha$  nos grupos tratados com diferentes concentrações de propranolol após indução da doença periodontal. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. O símbolo # demonstra diferença estatisticamente

significante entre os grupos sem doença periodontal e o grupo com doença periodontal e tratado com veículo. O símbolo \* indica diferença estatística entre o grupo com doença periodontal e tratado com veículo e os animais com doença periodontal e tratados com propranolol 0,1 mg/kg. (ANOVA seguido de Bonferroni).

.....49

**Figura 9** Expressão de ICAM-1 no tecido gengival detectado por Western blot (A). Comparação da expressão de ICAM-1 no tecido gengival (b). Pode-se observar que não existe diferença estatística do grupo que recebeu 0,1mg/Kg da droga com o grupo controle-salina ( $p > 0,05$ ) e uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos (controle DP-salina e tratados – 5mg/Kg e 20mg/kg)-  $p < 0,05$  (ANOVA –seguido de Bonferroni). .....50

**Figura 10** Expressão de RANKL no tecido gengival detectado por Western blot (A). Comparação da expressão de RANKL no tecido gengival (B). Podendo observar uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de RANKL no grupo 0,1mg/Kg quando comparado com o grupo DP-salina, não havendo uma diferença estatística com o grupo controle salina ( $p > 0,05$ ). (ANOVA seguido de Bonferroni).....51

**Figura 11** Comparação da viabilidade celular (%). Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ -ANOVA – seguido de Bonferroni). .....52

**Figura 12** Comparação da expressão de TRAP+células/campo em diferentes concentrações de propranolol (1,3 e 10 $\mu$ M). Havendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (ANOVA, seguido de Bonferroni). .....53

**Figura 13** Expressão de NF- $\kappa$ B em cultura de osteoclastos (A), após inserção de três concentrações (1, 3 e 10 $\mu$ M) de propranolol + LPS e sem LPS. Não havendo diferenças entre os grupos estimulados (LPS) + droga (propranolol)  $p > 0,05$  (ANOVA, seguido de Bonferroni (B).....54

**Figura 14** Expressão de NFATc em cultura de osteoclastos (A). Comparação dos níveis de expressão de NFATc em cultura de células após estímulo com LPS associado a três distintas concentrações de propranolol (2, 3 e 10 $\mu$ M), bem como grupos que recebeu somente a droga, LPS ou que não recebeu ambos (B). Havendo uma redução expressiva ( $p < 0,05$ ) nos níveis de NFATc no grupo que recebeu a droga na concentração de 1 $\mu$ M estimulado com LPS, quando comparado com os demais grupos (droga + LPS) (ANOVA, seguido de Bonferroni). .....55

**Figura 15** (A) Seta demonstra ponto escuro, característico de reabsorção óssea, sendo poucas áreas. (B) Círculos demonstram vários pontos escuros; acentuada reabsorção óssea. (C) Retângulo apresenta ponto de reabsorção, poucas áreas de reabsorção. ....56

**Figura 16** Representa focos de reabsorção óssea em discos de dentina, comparado com grupo que recebeu 1µM de droga e grupo que não recebeu a droga, no entanto ambos receberam LPS. Havendo portanto diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) com redução de focos de reabsorção no grupo que recebeu a droga (ANOVA, seguido de Bonferroni). ....57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Valores médios ( $\pm$ epm) da FC e da PAM.....	41
<b>Tabela 2</b> Valores médios ( $\pm$ epm) da PDFVE, dP/dT máxima e dP/dT mínima. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Anti- = Anticorpo

DCV = Doença Cardiovascular

dP/dT = Velocidade Máxima de Contração

dP/dT = Velocidade Máxima de Relaxamento

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético

ELISA = Ensaio Imunoenzimático

FC = Frequência Cardíaca

FDA = Food and Drug Administration

HDL = Lipoproteína de Alta Densidade

ICAM = Molécula de Adesão Intercelular

IL = Interleucina

ISIS = International Study of Infarct Survival

LDL-c = Lipoproteína de Baixa Densidade-c

MMP = Metaloproteinase

NFATc = Fator de Ativação de Células T

NF-κB = Fator Nuclear κBOPG = Osteoprotegerina

Ox = Oxidação

PA = Pressão Arterial

PAM = Pressão Arterial Média

PCR = Proteína C Reativa

PDFVE = Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

PGE<sub>2</sub> = Prostaglandinas E<sub>2</sub>

PMNs = Polimorfonucleares

RANK = Receptor Ativador de NF-kappaB

RANKL = Ativador do Ligante Fator Nuclear Kappa-B

SHR = Ratos Espontaneamente Hipertensos

SNS = Sistema Nervoso Simpático

TNF = Fator de Necrose Tumoral

VE = Ventrículo Esquerdo

β<sub>2</sub>-AR = β<sub>2</sub>-Adrenérgicos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.2	Agentes Bloqueadores Adrenérgicos	20
1.3	Propranolol	23
1.4	Metabolismo ósseo	24
1.5	Doença Periodontal	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
2.2.1	Análise “ <i>in vivo</i> ”	31
2.2.2	Análise “ <i>in vitro</i> ”:	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	Avaliações “ <i>in vivo</i> ”	33
3.1.1	CrITÉrios de seleção da amostra	33
3.1.2	Delineamento experimental	33
3.1.3	Indução da Doença Periodontal	34
3.1.4	Avaliação Hemodinâmica	34
3.1.5	Avaliação Histométrica	35
3.1.6	Quantificação de Citocinas por ELISA	35
3.1.7	Ensaio de Western Blot para Quantificação de ICAM-1 e RankL no Tecido Gengival	36
3.2	Avaliações “ <i>in vitro</i> ”	36
3.2.1	Cultura de Células (RAW264.7)	36
3.2.2	Osteoclastogênese	37
3.2.3	Viabilidade Celular	37
3.2.4	Coloração para Fosfatase Ácida (TRAP)	37

3.2.5 Atividade de reabsorção de Osteoclastos (BIOCOAT OSTEOLOGIC®).....	38
3.2.6 Expressão de fatores de transcrição (WESTERN BLOT).....	38
3.3 Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Avaliações “in vivo” .....	40
4.1.1 Parâmetros Hemodinâmicos .....	40
4.1.2 Análise Histométrica da Reabsorção Óssea.....	45
4.1.3 Quantificação das Citocinas (IL-1 $\beta$ E Tnf- $\alpha$ ) do Tecido Gengival por ELISA 47	
4.1.4 Quantificação de ICAM-1 e RANKL no Tecido Gengival.....	49
4.2 Avaliações “in vitro”.....	51
4.2.1 Viabilidade celular .....	51
4.2.2 Potencial Inibitório da Osteoclastogênese induzida pelo Propranolol .....	52
4.2.3 Expressão de NF- $\kappa$ B e NFTA $\alpha$ em células osteoclásticas .....	53
4.2.4 Reabsorção Óssea (Osteologic®).....	56
5 DISCUSSÃO .....	58
7 CONCLUSÃO .....	64
REFERÊNCIAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Para que a homeostase do tecido ósseo se mantenha, é necessário que a atividade das principais células ósseas esteja em equilíbrio; o osso é por sua vez constantemente remodelado através da ação dos osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, e dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea; esse processo, que é definido como remodelamento ósseo, é controlado por fatores locais, secretados pelas próprias células osteoblásticas ou osteoclásticas, e por fatores sistêmicos, incluindo uma série de hormônios (FONSECA, 2009). Recentemente, foi demonstrado que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é também um potente regulador do tecido ósseo, atuando como um inibidor da formação óssea e estimulador de reabsorção óssea, através de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR) (TAKEDA *et al.*, 2002; ELEFTERIOU *et al.*, 2005). Além disso, também foi demonstrada a expressão de receptores adrenérgicos e receptores de neuropeptídeos em células osteoblásticas e osteoclásticas humanas (TOGARI *et al.*, 1997; TOGARI *et al.*, 2002).

Recentemente, Bastos *et al.* (2010) demonstraram que o osso alveolar ao redor dos dentes sem ligadura (modelo de doença periodontal experimental em ratos) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), apresentaram uma maior expressão do receptor ativador do ligante fator nuclear kappa-B (RANKL) e maior proporção de RANKL/Osteoprotegerina (OPG), além de um elevado número de células de osteoclastos, aumento da perda óssea e diminuição da densidade óssea sugerindo que a hipertensão pode afetar diretamente o osso alveolar, independentemente do desafio ligadura.

O uso do propranolol tem sido alvo de diversos estudos voltados para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de algumas doenças ligadas a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (BONNET *et al.*, 2005; BONNET; PIERROZ; FERRARI, 2008). Antagonistas de receptores adrenérgicos surgiram em 1930 (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988), sendo modificadas e incorporadas para o tratamento de diversas doenças. O propranolol é uma droga antagonista  $\beta$ -adrenérgico comumente utilizado para tratar pressão alta, dor no peito (angina), ritmos anormais do coração, e algumas condições neurológicas (JAY, 2010).

Em trabalho realizado por Takeda *et al.* (2002), ficou demonstrado que a ação de um antagonista  $\beta_2$  (propranolol) é capaz de aumentar a massa óssea em camundongos; do mesmo modo BONNET *et al.* (2005) avaliaram a massa óssea, a resistência e a microarquitetura em ratas wistar tratadas por seis semanas com agonista de receptores  $\beta_2$  (Salbutamol 4mg/Kg/dia e Clenbuterol 2mg/Kg/dia) ou salina (0,5mL/Kg/dia) por via subcutânea, sendo observado nos grupos tratados com agonista  $\beta_2$  (Salbutamol e Clenbuterol) uma diminuição significativa de minerais e um decréscimo no comprimento e largura cortical femural, quando comparado com o controle salina, sendo mais afetado o grupo que recebeu Clenbuterol na avaliação da resistência óssea e na microarquitetura quando comparado com o Salbutamol; em contraste, Reid *et al.* (2005) demonstraram através de um estudo randomizado com mulheres no período pós-menopausa, que após serem tratadas com propranolol (160mg/dia) durante 3 meses houve um decréscimo de osteocalcina no soro de quase 20% das mulheres já nas duas primeiras semanas iniciais, sendo aumentado o efeito ao longo do tempo. Porém não foi observado nesse mesmo estudo diminuição de outros marcadores de osteoclastos, como pró-colágeno tipo I e atividade da fosfatase alcalina. Assim, devido à divergência encontrada nos trabalhos justifica-se a necessidade de uma melhor compreensão nos efeitos farmacológicos e a participação do mecanismo regulatório neuroendócrino no metabolismo ósseo, bem como a interação das doses nos seus diversos aspectos funcionais.

### **1.1 Adrenoreceptores**

Antes que a acetilcolina, norepinefrina ou epinefrina secretadas em uma terminação nervosa autônoma possam estimular um órgão efector, elas devem primeiro se ligar a receptores específicos nas células efectoras. A molécula protéica do receptor alterada excita ou inibe a célula, geralmente por (1) causar uma mudança na permeabilidade da membrana celular em um ou mais íons, ou (2) ativar ou inativar uma enzima ligada do outro lado do receptor protéico onde ele se projeta para o interior da célula (GUYTON & HALL, 2006).

Em se tratando de receptores adrenérgicos, existem dois tipos principais, alfa e beta; existindo uma subdivisão de receptores alfa, em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (GUYTON & HALL, 2006). Já os receptores adrenérgicos beta foram classificados como  $\beta_1$  e  $\beta_2$  desde 1967 por Lands *et al.* Essa subdivisão levou à descoberta de drogas seletivas para o tratamento da hipertensão e asma e já no início da década de 1980, um novo subtipo de receptores  $\beta$ -adrenérgico foi descrito (ARCH, 1989) e mais tarde chamado de receptor adrenérgico  $\beta_3$ , sendo observado em várias espécies, incluindo, homens, ratos, bovinos e camundongos (STROSBURG & PIETRI-ROUXEL, 1996).

Tais receptores, após a estimulação por seus ligantes desempenham papéis fundamentais na manutenção da vida, como exemplo o receptor Alfa contribui para vasoconstrição, dilatação da íris, relaxamento intestinal, contração dos esfíncteres intestinais, contração pilomotora, contração do esfíncter vesical entre outras; já o receptor beta contribui para vasodilatação ( $\beta_2$ ), cardioaceleração ( $\beta_1$ ), força aumentada do miocárdio ( $\beta_1$ ), relaxamento uterino ( $\beta_2$ ), broncodilatação ( $\beta_2$ ), calorigênese ( $\beta_2$ ), glicogenólise ( $\beta_2$ ), lipólise ( $\beta_1$ ), relaxamento da parede da bexiga ( $\beta_2$ ), lipólise ( $\beta_3$ ) entre outras (GUYTON & HALL, 2006; PERRONE *et al.*, 2007). Além disso, fibras nervosas simpáticas e sensoriais estão presentes em osteoclastos e osteoblastos.

## 1.2 Agentes Bloqueadores Adrenérgicos

Agentes bloqueadores adrenérgicos, também chamados adrenolíticos e simpátolíticos, são fármacos que inibem seletivamente determinadas respostas do estímulo simpático ou bloqueiam os efeitos produzidos por agentes simpatomiméticos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Os primeiros agentes bloqueadores adrenérgicos foram os alcalóides do esporão do centeio, cuja atividade foi relatada por Dale nos seus clássicos estudos, em 1906. Entretanto, o esporão do centeio, obtido da *Claviceps purpurea*, fungo parasita do centeio, foi usado por parteiras na Idade Média e até mesmo antes de Cristo para induzir ao parto. Após a descoberta de Dale, iniciou-se um amplo

programa de pesquisas químicas que finalmente resultou no isolamento do primeiro alcalóide do esporão do centeio, em 1922, por Stoll *et al.* (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Os agentes bloqueadores adrenérgicos sintéticos surgiram em 1930, quando se observou pela primeira vez que alguns éteres dialquilaminoalquílicos de fenóis alquilados, tais como gravitol e tastromina, apresentavam atividades farmacológicas semelhantes, embora mais fracas, às dos alcalóides do esporão do centeio (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). A síntese e o ensaio de centenas de compostos análogos resultaram na introdução, em 1933, por Fourneau e Bovet, de derivados do benzodioxano tais como piperoxano, isómero substituído do gravitol. A tolazolina e a fentolamina foram introduzidas em 1946 (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Os agentes bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos tornaram-se conhecidos no final da década de 1950, quando Powell e Slater verificaram que o dicloroisoproterenol (DIC) bloqueava as propriedades miocárdio-estimulantes da isoprenalina (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). A modificação molecular do DCI, que não é usado clinicamente, mas apenas como ferramenta de trabalho experimental, resultou em agentes menos tóxicos, tais como pronetalol (BLACK & STEPHENSON, 1962) e o propranolol (Inderal<sup>®</sup>) (BLACK *et al.*, 1964), o qual foi inicialmente descrito por ser um fármaco bloqueador de receptor  $\beta$  em animais e no homem sendo cerca de dez vezes mais potente do que o pronetalol e não ter relação cancerígena em camundongos e outros animais experimentais.

Os agentes bloqueadores adrenérgicos podem ser divididos em três classes: agentes bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos, agentes bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, agentes bloqueadores de neurônios adrenérgicos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Os betabloqueadores podem ser classificados pelo grau de cardiosseletividade em relação ao seu efeito em bloquear receptores beta-1 adrenérgicos no coração comparados com aqueles que bloqueiam receptores beta-2 nos brônquios, vasos sanguíneos periféricos entre outros (FIRMIDA, 2001).

As drogas de primeira geração, como o propranolol, timolol, pindolol, nadolol, sotalol e outras, possuem atividades não seletivas e não-vasodilatadoras. Alguns desses agentes, como o pindolol e o nadolol, na verdade apresentam atividade simpaticomimética intrínseca; os agentes de segunda geração, como o

atenolol, o bisoprolol e o metoprolol, entre outros, eram seletivos quanto ao receptor beta-adrenérgico, mas são igualmente não-vasodilatadores; o xametarol é um agente com propriedade beta bloqueadora seletiva e vasodilatadora (FIRMIDA, 2001). Além disso, apesar da piora clínica inicial, em alguns casos, provavelmente pela retirada do suporte adrenérgico, os estudos demonstraram melhora clínica em longo prazo, na evolução da insuficiência cardíaca, com redução dos episódios de agravamento da síndrome e da necessidade de hospitalização, nos grupos tratados com beta bloqueadores; posteriormente, demonstrou-se também redução significativa da mortalidade com a terapêutica de beta bloqueadores (ALBANESI, 1998).

Os fármacos mais utilizados nesses ensaios, que já envolveram cerca de dez mil pacientes, foram metoprolol, bisoprolol e carvedilol (BATLOUNI & ALBUQUERQUE, 2000). Nos estudos envolvendo beta bloqueadores beta-1 seletivos, como o estudo *Cardiac Insufficiency Bisoprolol* (CIBIS, 1994), o *Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC)* (WAAGSTEIN *et al.*, 1993) e o primeiro *International Study of Infarct Survival (ISIS)*, verificou-se que o tratamento não apresentou qualquer impacto sobre a morte súbita de origem cardíaca, o que pode ser explicado pelo bloqueio de apenas um tipo de receptor beta, com o segundo receptor permitindo ainda transmissão adrenérgica substancial para o miócito, o que perpetua o risco de morte por arritmia. Em contraste, nos estudos utilizando agentes não-seletivos (timolol e propranolol), a incidência de morte súbita foi reduzida (YOUNG *et al.*, 2000).

Aparentemente tanto os betabloqueadores seletivos quanto os não seletivos têm produzido efeitos favoráveis nos estudos clínicos, mas esses agentes diferem, de qualquer forma, quanto ao grau de interferência sobre os efeitos adversos sobre o sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, sobre o coração e a circulação. Em alguns estudos clínicos e experimentais o bloqueio alfa e beta combinados oferecem maior grau de proteção contra os efeitos tóxicos das catecolaminas e benefícios hemodinâmicos superiores ao uso isolado de betabloqueadores (FIRMIDA, 2001).

### 1.3 Propranolol

O propranolol é uma droga comumente utilizada na prática médica, é um agente bloqueador beta-adrenérgico que é usado para tratar pressão alta, dor no peito (angina), ritmos anormais do coração, e algumas condições neurológicas (MARKS, 2010). Também se prescreve beta bloqueadores para ansiedade de desempenho, a fim de interromper a retroalimentação positiva, dada pelo sistema autônomo (FONTANELLA, 2003).

Uma vez que a estimulação do sistema nervoso simpático é responsável por aumentar a taxa com que o coração bate, ao bloquear a ação destes nervos, o propranolol reduz a frequência cardíaca e é útil no tratamento do ritmo cardíaco acelerado; reduz também a força de contração do músculo cardíaco e, conseqüentemente, reduz a pressão arterial e ao reduzir a frequência cardíaca e a força de contração muscular, o propranolol reduz a necessidade de oxigênio pelo músculo cardíaco (MARKS, 2010). A dor do coração (angina pectoris) ocorre quando a demanda de oxigênio no músculo cardíaco excede o suprimento de oxigênio, portanto o propranolol reduzindo a demanda por oxigênio, é útil no tratamento de dor no coração (MARKS, 2010). O Food and Drug Administration (FDA) aprovou o propranolol em novembro de 1967.

Outros usos para o propranolol incluem a prevenção de enxaquecas e tratamento de certos tipos de tremores (familiar ou hereditário tremor essencial). Propranolol é usado geralmente em pessoas com hipertireoidismo para diminuir a frequência cardíaca e tremores (MARKS, 2010).

A substância presente no propranolol pode promover broncospasmo e bloquear o efeito broncodilatador da epinefrina nos pacientes que sofrem de alergia, asma brônquica, enfisema pulmonar ou bronquite não alérgica, oferece ainda risco de maior depressão da contratilidade miocárdica, por isso deve ser administrado com cautela aos que sofrem de insuficiência cardíaca congestiva, podendo mascarar a taquicardia associada com hipoglicemia nos pacientes tratados com insulina ou hipoglicemia oral; devendo ser utilizado com cautela nos pacientes que sofrem de insuficiência renal ou hepática, hipertireodismo e depressão mental; além de poder

reduzir a circulação periférica em pacientes que sofrem da síndrome de Raynaud e outras doenças vasculares periféricas (HAYES *et al.*, 1990; LEBTEC *et al.*, 1984).

Contudo, estudos sobre o uso do propranolol no que concerne o seu efeito sobre o tecido ósseo ainda são necessários. Bonnet *et al* (2005) demonstrou que o uso de baixas doses de propranolol teve efeito positivo na microarquitetura de ossos submetidos a tensão de força. Além disso, o uso de propranolol em ratas ovariectomizadas foi capaz de diminuir a perda óssea induzida pela diminuição hormonal (BONNET *et al.* ,2008).

#### **1.4 Metabolismo ósseo**

O osso é um tecido vivo com uma matriz protéica colagenosa impregnada com sais minerais, especialmente fosfato de cálcio, de modo que a qualidade óssea ou microarquitetura trabecular é responsável por cerca de 30 a 50% de sua resistência mecânica (GANONG, 1977; KLEEREKOPER *et al.*, 1985; RUSSO, 2001; STEVENSON & WHITEHEAD, 1982). A remodelação óssea é um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para a renovação do esqueleto e preservação da sua qualidade (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002). O osso sofre contínua deposição de osteoblastos e ininterrupta absorção nos locais onde os osteoclastos se encontram ativos; os osteoblastos são encontrados nas superfícies externas e nas cavidades ósseas (GUYTON & HALL, 2006).

As células ósseas primariamente relacionadas com a remodelagem óssea são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, onde os osteoblastos são as células formadoras dos ossos, já que secretam colágenos e formam a matriz que as envolve, a qual então se calcifica; os osteócitos são células ósseas envolvidas pela matriz calcificada; os osteoclastos são células multinucleadas, responsáveis pela reabsorção de ossos previamente formados (GANONG, 1977). Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são processos antagônicos, mas que estão acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em

ganho ou perda de massa óssea (HANLEY, 2000; RICO *et al.*, 1992; VIEIRA, 1998; VIEIRA, 1999).

O osso também sofre uma contínua absorção na presença de osteoclastos, que correspondem a grandes células fagocitárias multinucleadas (com o equivalente a 50 núcleos), derivadas de monócitos ou células semelhantes a monócitos formadas na medula óssea (GUYTON & HALL, 2006). Os osteoclastos apresentam-se normalmente ativos em menos de 1% das superfícies ósseas do adulto; do ponto de vista histológico, a absorção óssea ocorre nas adjacências imediatas aos osteoclastos; acreditando-se que o mecanismo dessa absorção seja o seguinte: os osteoclastos emitem suas projeções semelhantes a vilos em direção ao osso, formando assim a chamada borda pregueada adjacente ao osso, sendo liberado no local dois tipos de substâncias: (1) enzimas proteolíticas, liberadas de lisossomos dos osteoclastos, e (2) diversos ácidos, liberados de mitocôndrias e vesículas secretoras onde as enzimas diferem ou dissolvem a matriz orgânica do osso, enquanto os ácidos provocam a dissolução dos sais ósseos; as células osteoclásticas também absorvem minúsculas partículas de matriz óssea e cristais por fagocitose, dissolvendo-os e liberando os produtos no sangue (GUYTON & HALL, 2006).

Um fator intermediário, RANKL, presente na superfície dos osteoblastos foi encontrado, sendo o mesmo responsável pela indução de osteoclastogênese (YASUDA, 1999), juntamente com seus receptores celulares, receptor ativador de NF-kappaB (RANK) e receptor OPG. O RANKL é produzido por células de linhagem osteoblástica e por linfócitos T ativados, sendo o fator essencial para a formação, fusão, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, resultando na reabsorção óssea (HOFBAUER, 2001). O RANKL ativa seus receptores específicos, o RANK que se localiza em osteoclastos, e sua sinalização em cascata envolvem a estimulação dos precursores c-jun, NF-kappaB, e serina/ treonina quinase PKB/Akt (HOFBAUER, 2001). Os efeitos da RANKL são contrabalanceados pela OPG que atua como um receptor solúvel neutralizador (HOFBAUER, 2001).

RANKL e OPG são regulados por vários hormônios (glicocorticóides, vitamina D, estrogênio), citocinas (fator necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 4, 6, 11 e 17), e vários fatores de transcrição mesenquimal (tais como cbfa-1). OPG também é produzida por células do ligamento periodontal humano (HASEGAWA *et al.*, 2002),

fibroblastos gengivais, células pulpares e células epiteliais (SAKATA *et al.*, 1999) e mostrou ser um fator fundamental para inibição de diferenciação e ativação de osteoclastos (HOFBAUER, 2001) na remodelação óssea alveolar durante a movimentação ortodôntica (TOYGAR *et al.*, 2008). Estudos clínicos confirmaram que ambos RANKL e OPG podem ser detectados em fluído crevicular gengival humano (NISHIJIMA *et al.*, 2006; KAWASAKI *et al.*, 2006).

Inflamação e perda óssea estão intimamente relacionados e esta associação é considerada clinicamente na artrite séptica, osteomielite, artrite reumatóide (AR), bem como na periodontite (CHAKRAVARTI, 2009). Na verdade, na maioria dessas condições, a perda óssea inicia-se cedo no processo da doença e é uma causa de morbidade considerável (CHAKRAVARTI, 2009). Essas lesões ósseas destrutivas são resultado da atividade excessiva de células como osteoclastos que promovem a reabsorção óssea (ROODMAN, 1996).

Anormalidades do sistema RANKL/OPG implicam na patogênese da osteoporose pós-menopausa, artrite reumatóide, doença de Paget, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas e hipercalcemia, enquanto a administração do OPG demonstrou prevenir ou atenuar esses transtornos em modelos animais; excesso ou defeito na produção de RANKL, RANK e OPG exibem os extremos de fenótipos esqueléticos – osteoporose e osteopetrose (HOFBAUER, 2001). A descoberta e caracterização de RANKL, RANK e OPG somados a estudos posteriores alteraram os conceitos de metabolismo ósseo, e levaram a melhor compreensão da patogênese das doenças ósseas metabólicas em busca de medicamentos que poderão constituir a base de estratégias terapêuticas inovadoras (HOFBAUER, 2001). Outro fator associado a modulação de ativação de osteoclastos em processo inflamatórios é o NFAT, cuja família NFAT pertence a fatores de transcrição que foi originalmente descoberto em células T, mas eles estão envolvidos na regulação de vários sistemas biológicos (CRABTREE & OLSON, 2002). O papel essencial e suficiente do gene *Nfatc1* na osteoclastogênese foi mostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (TAKAYANAGI *et al.*, 2002).

## 1.5 Doença Periodontal

A porcentagem de doença periodontal (DP) na população dos países desenvolvidos e em desenvolvimento é alta (ALBANDAR *et al.*, 1999; ALBANDAR, 2002; BAELUM *et al.*, 2003). No sul do Brasil, um estudo observou que 79% da população com idade entre 30 e 103 anos apresentaram altos níveis de perda de inserção clínica (SUSIN *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, as doenças periodontais têm sido divididas em duas categorias, baseadas na ocorrência de perda de inserção dos tecidos: gengivite e periodontite (Committee of the American Academy of Peridontology, 2004). A gengivite é caracterizada pela presença de inflamação crônica na margem gengival, refere-se à inflamação limitada aos tecidos moles que circundam os dentes, não inclui os processos inflamatórios que podem estender-se à crista alveolar subjacente, ligamento periodontal ou cemento e a mesma pode estar associada a diversos fatores (influenciada por medicamentos, gengivite ulcerativa necrosante, gengivite alérgica e a infecções específicas como herpes simples, vírus da imunodeficiência humana etc.) (NEVILLE *et al.*, 1998). Clinicamente, manifesta-se como um tecido avermelhado, que apresenta edema, sangramento, mudança no contorno, perda de adaptação do tecido e aumento do fluido crevicular gengival (CIMASONI *et al.*, 1983; GREENSTEIN *et al.*, 1984).

O desenvolvimento da gengivite requer uma placa bacteriana, que por sua vez induz o tecido gengival a mudanças patológicas direta e indiretamente (LÖE *et al.*, 1965, PAGE 1986). A lesão inicial aparece como uma inflamação aguda caracterizada pela presença de um infiltrado de neutrófilos, sendo notadas alterações vasculares, mudanças nas células epiteliais e degradação do colágeno (NEVILLE *et al.*, 1998). Em relação à periodontite que é um processo inflamatório que afeta as estruturas de suporte dos dentes: ligamento periodontal, osso alveolar e cemento, e com a continuação, o processo pode levar à perda de aderência, com destruição do ligamento periodontal e osso alveolar (NEVILLE *et al.*, 1998). A migração apical do epitélio do sulco, ao longo da superfície da raiz, resulta na formação de bolsas periodontais, havendo possibilidade de mobilidade e eventual perda dos dentes. A periodontite está associada, predominantemente, com

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, além de vários outros microrganismos que ocasionalmente podem estar envolvidos na periodontite ativa (NEVILLE *et al.*, 1998). O aumento da destruição tecidual nas lesões periodontais é o resultado da ação indireta das bactérias, assim como devido à resposta imunoinflamatória nos tecidos do hospedeiro os quais promovem ativação de leucócitos: monócitos, linfócitos, fibroblastos, entre outras células, que em conjunto com os componentes bacterianos (LPS) estimulam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Committee of American Academy of Periodontology, 1999).

Por sua vez, as citocinas e os mediadores inflamatórios promovem a liberação das enzimas teciduais, recruta células inflamatórias, facilita a degranulação dos Polimorfonucleares (PMNs), aumenta a síntese das metaloproteinase (MMP), inibem a síntese de colágeno e ativam os linfócitos B e T (OFFENBACHER 1996; IACOPINO *et al.*, 2000). As citocinas e mediadores inflamatórios mais encontrados na periodontite são: Interleucina (IL)-1 $\beta$ , principalmente IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (Committee of American Academy of Periodontology, 1999). Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é o principal marcador para apoptose celular, reabsorção óssea, secreção de MMP, expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) e produção da IL-6, estimula a formação de osteoclastos, e conseqüentemente a reabsorção óssea, e facilita a diferenciação das células T (IACOPINO *et al.*, 2000).

Pesquisas também demonstram uma íntima ligação de doenças cardiovasculares (VIEIRA, 2008) e osteoporose (LOPES, 2008) com doença periodontal. São descritos quatro caminhos específicos relatados para explicar a ligação entre as infecções periodontais e o risco de doença cardiovascular (PAQUETTE *et al.*, 2007). Com relação ao primeiro caminho, há reconhecidamente duas bactérias, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus sanguinis*, que induzem agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo*, às quais pensa-se que estejam associadas à formação do trombo (HERZBERG *et al.*, 1996; HERZBERG *et al.*, 1998).

No segundo, mecanismo, autoimune, produzido por anticorpos que atuam nas proteínas *Heat-shock* (proteína-60 de 'choque-térmico'), onde alguns microrganismos periodontais contêm proteínas que desencadeiam uma reação imunológica cruzada com constituintes do endotélio, como é o caso da Hsp-60; esta proteína, produzida pelo Tf, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e pela

*Porphyromonas gingivalis* (Pg), tem 60% de homologia na sua estrutura molecular com as proteínas de 'choque-térmico' dos mamíferos (YAMAZAKI *et al.*, 2002). Anticorpos contra Hsp estão presentes em grandes quantidades em pacientes com aterosclerose, identificados no endotélio, nas células musculares lisas em ateromas e na íntima (RIDKER *et al.*, 1997).

Referente ao terceiro mecanismo de ação da DP no desenvolvimento da doença cardiovascular refere-se à invasão de *Porphyromonas gengivalis* nas células endoteliais vasculares (DESHPANDE *et al.*, 1998). Giacona *et al.*, (2004) observaram que macrófagos fagocitavam Pf e transformaram-se em células espumosas na presença de lipoproteína de baixa densidade-c (LDL-c) *in vitro*.

O quarto processo é verificado a partir dos efeitos indiretos da DP por meio de suas citocinas e mediadores inflamatórios, onde pacientes com extensa doença periodontal possuem níveis elevados de proteína C reativa (PCR) quando comparados a pacientes sem a doença (SLADE *et al.*, 2000; NOACK *et al.*, 2001; D'AIUTO *et al.*, 2004; SALZBERG *et al.*, 2006). A PCR é liberada pelo fígado e representa um sinalizador não-específico de infecções e agressões no organismo; onde alguns estudos relacionaram a presença de níveis elevados de PCR como um importante marcador para doença cardiovascular (DCV) (RIDKER *et al.*, 1997; RIDKER *et al.*, 1998). Wu *et al.* (2001) encontraram associação entre os níveis de PCR e de fibrinogênio do plasma com má saúde periodontal. SALZBERG *et al.* (2006) comparam os níveis de PCR em 93 indivíduos com periodontite grave generalizada, 97 com periodontite grave localizada e 91 indivíduos saudáveis. Os três grupos apresentaram diferenças significantes entre eles. Os dois grupos com periodontite grave apresentaram níveis significativamente mais elevados de PCR quando comparado ao grupo controle; e quando comparados entre eles, o grupo com periodontite grave generalizada apresentou níveis mais altos do que o grupo com periodontite grave localizada.

A exposição sistêmica a infecções pode resultar na liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que alteram o metabolismo lipídico, promovem a hiperlipidemia, a hipertrigliceremia e a oxidação de lipídeos (IACOPINO *et al.*, 2000). Processos infecciosos promovem um aumento nos níveis de LDL-c e acúmulo de oxLDL nos leitos ateroscleróticos (PUSSINEN *et al.*, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que a periodontite promove alteração na distribuição de lipoproteínas e

na composição de subclasses, resultando na redução dos níveis de Lipoproteína de Alta Densidade-c (HDL-c); onde a HDL-c promove ação antiaterogênica, neutralizando lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea e inibindo a oxidação do LDP-c, tendo o aumento do catabolismo do HDL-c ocorrido nas infecções pode ser uma das causas de sua redução (PUSSINEN *et al.*, 2004).

Os estudos histológicos mostraram que o osso e o periósteo recebem uma fonte rica de fibras nervosas sensoriais e simpáticos, cuja densidade é maior em torno das placas de crescimento e na metáfise dos ossos longos (SERRE *et al.*, 1999). As terminações nervosas foram encontrados em contato direto com células do osso, e foram identificado catecolamina nos axônios perto de osteoblastos (SERRE *et al.*, 1999), sugerindo uma regulação neuroendócrina de remodelação óssea. Recentemente, o papel da inervação óssea chamou atenção pela descrição de um regulamento central leptina dependente da remodelação óssea através do sistema  $\beta$ -adrenérgico, mostrando uma relação entre o mecanismo de ativação celular por adrenoreceptores e metabolismo ósseo (TAKEDA *et al.*, 2002; KARSENTY, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos imunomodulatórios de diferentes doses de um inibidor de receptor  $\beta$ -adrenérgico (propranolol) em um modelo de doença periodontal experimental e sua ação *in vitro* em células osteoclasticas.

### 2.2 Objetivos específicos

#### 2.2.1 Análise “*in vivo*”:

- a) Avaliar os parâmetros hemodinâmicos (Pressão arterial média, frequência cardíaca, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento) dos animais tratados com diferentes doses de propranolol;
- b) Analisar a reabsorção óssea inter-radicular;
- c) Quantificar os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) no tecido gengival de animais com doença periodontal e tratados com diferentes doses de propranolol;
- d) Avaliar a expressão de proteínas (ICAM-1 e RANKL) no triturado gengival de animais com doença periodontal e tratados com diferentes dose de propranolol.

### **2.2.2 Análise “*in vitro*”:**

- a) Avaliar o potencial de inibição da osteoclastogênese (coloração de TRAP) após estímulo com LPS, RANKL e na presença de Propranolol;
- b) Avaliar a expressão de proteínas (NF- $\kappa$ B e NFATc) em cultura de osteoclastos (células RAW264.7) cultivadas na presença de propranolol.
- c) Mensurar a viabilidade celular após o cultivo na presença do propranolol;
- d) Avaliar o potencial de inibição da atividade osteoclástica.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Avaliações “*in vivo*”

#### 3.1.1 Critérios de seleção da amostra

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Uberaba (#048/2009). Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, Wistar), com peso médio de 250g, originários do Biotério Central da Universidade de Uberaba. Antes dos procedimentos experimentais, os animais passaram por um período de 10 dias para a aclimação ao biotério de manutenção, sendo alimentados com ração e água *ad libitum*, e mantidos no local de origem.

#### 3.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos através de sorteio (aleatorização), caracterizando um delineamento completamente casualizado (MONTGOMERY, 1991). Os animais foram divididos em 4 grupos como segue: Grupo A – (n=10) sem tratamento e ligadura; Grupo B – (n=10) administração via oral diária de 0,1 mg/kg de uma solução de Propranolol associada à indução a doença periodontal experimental com ligadura; Grupo C - (n=10) administração diária via oral de 5mg/kg de uma solução de propranolol associada à indução a doença periodontal experimental com ligadura; Grupo D - (n=10) administração diária via oral de 20mg/kg de uma solução de propranolol associada à indução a doença periodontal experimental com ligadura; Grupo E - (n=10) administração diária via oral de veículo (Salina) associada a indução de doença periodontal experimental com ligadura.

### 3.1.3 Indução da Doença Periodontal

Os animais inicialmente foram anestesiados através de injeção intramuscular na região externa da coxa, com uma solução de 0,8 mg/kg de cloridrato de ketamina (Francotar<sup>®</sup>) e 0,3 mg/kg de cloridrato de xilazina (Virbaxyl<sup>®</sup> 2%) (Virbac do Brasil Ind./Com. LTDA). Após este procedimento, colocou-se uma ligadura de fio de seda (Gutterman) ao redor dos 1º molares superiores e inferiores ao nível do sulco gengival, de acordo com técnica descrita por Johnson (1975). Este fio atuou como irritante gengival e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana.

### 3.1.4 Avaliação Hemodinâmica

Após 30 dias da indução da doença periodontal e do tratamento com as diferentes doses de propranolol, 4 animais de cada grupo correspondente foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, *i.p.*) e colocados em mesa cirúrgica na posição de decúbito dorsal. Logo após, realizaram-se incisões medianas de  $\pm 3$  cm na região do pescoço onde a carótida comum direita foi exposta. Cânulas de polietileno PE 50 (Clay Adams Brand, Polyethylene Tubing, Becton Dickinson, Sparks, USA) foram introduzidas na carótida comum direita para registro direto da PA intra-arterial e intra-ventricular, que posteriormente foi conectada a um transdutor de pressão arterial (PA) e a um amplificador de sinais (Model 8805A, Hewlett-Packard, USA), onde o sinal passou a ser convertido por placa analógico-digital (com frequência de amostragem - 1000Hz) acoplada a um sistema computadorizado de aquisição de dados (Aqdados, Lynx Tec. Eletron. SA, São Paulo, Brasil). Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivadas da PA pulsátil, que passou ser continuamente registrada por um período de 10 min. Em seguida, a cânula de polietileno foi introduzida até o ventrículo esquerdo (VE), onde a pressão ventricular esquerda foi registrada continuamente por mais 10 min. A partir do sinal

da pressão ventricular esquerda, a pressão diastólica final do VE (PDFVE), a  $dP/dT$  máxima (velocidade máxima de contração) e a  $dP/dT$  mínima (velocidade máxima de relaxamento) foram calculadas, os quais foram constituídas nos parâmetros hemodinâmicos ventriculares avaliados (DIAS-DA-SILVA *et al.*, 2009). Estes parâmetros foram avaliados no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob supervisão do Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.

### **3.1.5 Avaliação Histométrica**

Após a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos ainda sob efeito do anestésico (item 3.4), os animais foram mortos por deslocamento cervical. As mandíbulas foram removidas completamente e fixadas em formol tamponado neutro 10 %, e divididas pela sínfise mandibular. A descalcificação foi realizada em EDTA 10%, seguindo posteriormente a tramitação laboratorial de rotina. Secções seriadas com 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina. As imagens assim capturadas foram gravadas para posterior utilização com o programa de análise de imagem “imageJ” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A perda óssea inter-radicular foi quantificada, pelo delineamento do espaço entre o osso alveolar e coroa dental (NAPIMOGA *et al.*, 2009).

### **3.1.6 Quantificação de Citocinas por ELISA**

Após o sacrifício dos animais, coletou-se o tecido gengival ao redor da ligadura sendo o mesmo armazenado em tampão de ELISA. O tecido foi macerado com o auxílio de um polítron e em seguida centrifugado (10.000 rpm/10 min), sendo o sobrenadante transferido para outro tubo. Foi realizada quantificação das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  através de ensaio de ELISA (NAPIMOGA *et al.*, 2009).

### 3.1.7 Ensaio de Western Blot para Quantificação de ICAM-1 e RankL no Tecido Gengival

Após homogeneização de outro fragmento de tecido gengival em tampão RIPA Lysis buffer, foi realizada a dosagem das proteínas por meio do kit Micro BCA protein assay (Pierce Biotechnology). Foram utilizadas 90µg de proteínas as quais foram submetidas à eletroforese (25mA por 2 h). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (30V por 2 h) e a mesma ficou imersa em tampão de bloqueio (TBST + 5% de leite desnatado) overnight à 4°C. Após estes procedimentos ocorreu uma incubação com o anticorpo primário (anti-RANKL, anti-ICAM-1 ou anti- $\alpha$  tubulina) por 2h sob agitação, sendo posteriormente lavado (6x) com TBST por 5 min cada sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por 1h sob agitação, procedendo com lavagens (6x) de 5min cada sob agitação, sendo posteriormente incubado com reagente ECL (ECL Plus Amersham) por 1 minuto. A membrana foi exposta a filme radiográfico (Kodak) em câmara escura e o filme revelado. Realizou-se a quantificação das bandas por meio da mensuração da área (pixel<sup>2</sup>) das bandas utilizando o programa "ImageJ" (HASSUMI *et al.*, 2009).

## 3.2 Avaliações "*in vitro*"

### 3.2.1 Cultura de Células (RAW264.7)

As células precursoras monócito/macrófago RAW264.7 foram mantidas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de Meio Eagle Modificado por Dulbeccos (D-MEM) (Gibco) acrescida de solução antibiótica penicilina/estreptomicina (Gibco) 100 mg/mL, 2,20 g/L bicarbonato de sódio e suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Os experimentos destas células foram realizados após o terceiro repique.

### 3.2.2 Osteoclastogênese

As células RAW264.7 foram utilizadas para o experimento após atingirem a confluência na garrafa, possibilitando assim, o repique em placas de micro titulação com 96 poços. Após a tripsinização das células contidas na garrafa, foram adicionados 10 mL de D-MEM e transferido para tubo de centrifuga. As células foram submetidas a uma centrifugação de 1200 rpm a 10°C durante 5 minutos e re-suspensas em 2 mL de DMEM. Uma alíquota de 10 µL desta suspensão de células foi transferida para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Foi adicionada uma concentração final de  $5 \times 10^3$  células/mL em cada poço (HASSUMI *et al.*, 2009).

As células foram estimuladas com RANKL (50 ng/mL, Preprotech) por 72 horas, sendo então adicionado propranolol nas concentrações de 1, 3 e 10 µM juntamente com DMEM além de LPS (2,5 µg/mL). As células foram coradas com TRAP após 6 dias. Os experimentos foram repetidos em dois momentos independentes sendo ambos em triplicata.

### 3.2.3 Viabilidade Celular

Com a finalidade de se determinar a viabilidade das células, à suspensão de células contendo diferentes concentrações de propranolol (1, 3 e 10 µM), LPS e somente meio de cultura (0,9 mL) foi acrescido azul tripan (0,1 mL a 0,2%). Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e realizada a contagem percentual, sendo consideradas mortas (inviáveis) as células que incorporavam o corante e, vivas as que excluíam o azul tripan.

### 3.2.4 Coloração para Fosfatase Ácida (TRAP)

Após o período de 6 dias, as células aderentes foram fixadas com 5% de formalina por 90 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e novamente incubadas por 90 minutos com solução de Tartarato 150 mM. Na seqüência, foram incubadas durante 10 minutos com solução de coloração para fosfatase ácida (TRAP). As células TRAP positivas apresentaram uma tonalidade vermelho-escuro (KAWAI *et al.*, 2000). Apenas as células contendo mais de 3 núcleos (multinucleadas) coradas em vermelho-escuro foram contadas como sendo osteoclastos maduros.

### **3.2.5 Atividade de reabsorção de Osteoclastos (BIOCOAT OSTEOLOGIC®)**

Células RAW264.7 (concentração de  $2 \times 10^3$  células/mL) foram cultivadas em D-MEM em poços do sistema Biocoat Osteologic (BD) e estimuladas com RANKL (50ng/mL) na presença ou não da dose de 1  $\mu$ M de propranolol por 10 dias. Novo meio de cultura contendo os reagentes foi adicionado a cada 3 dias. Após o período de incubação, os poços foram lavados inicialmente com PBS seguido de uma segunda lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos para remoção das células aderidas. Os pontos de reabsorção foram contados.

### **3.2.6 Expressão de fatores de transcrição**

As células RAW264.7 foram incubadas com RANKL e propranolol por 4 dias. Após este período, as proteínas foram extraídas com o auxílio de um tampão de extração RIPAS Lysis Buffer e realizada a dosagem das proteínas por meio do kit Micro BCA protein assay (Pierce Biotechnology). Foram utilizadas 90 $\mu$ g de proteínas as quais foram submetidas à eletroforese (25mA por 2 horas). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (30V por 2 h) e a membrana ficou imersa em tampão de bloqueio (TBST + 5% de leite desnatado) overnight à 4°C. Após estes procedimentos ocorreu uma

incubação com o anticorpo primário (anti-NF- $\kappa$ B p65 - 1:1000 ou anti-NFATc - 1:1000) por 2h sob agitação, sendo posteriormente lavado (6x) com TBST por 5 min cada sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (1:2000) por 1h sob agitação, procedendo com lavagens (6x) de 5min cada sob agitação, sendo posteriormente incubado com reagente ECL (ECL Plus Amersham) por 1 minuto. A membrana foi exposta à filme radiográfico (Kodak) em câmara escura, por fim foi revelado o filme. Realizou-se a quantificação das bandas por meio da mensuração da área das bandas utilizando o programa “ImageJ” (NAPIMOGA *et al.*, 2008).

### 3.3 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$ epm). Os parâmetros hemodinâmicos foram comparados através do teste ANOVA “one way” seguido pelo pós-teste de *Tukey* ou ANOVA “one way” on Ranks seguido pelo pós-teste de *Dunn's* em caso de distribuição não normal. Os demais testes foram feitos análise de ANOVA seguido do teste de Bonferroni, as diferença entre os parâmetros foi considerada significativa quando  $P \leq 0,05$ . As análises foram conduzidas utilizando o software SigmaStat (Jandel Scientific Software; SPSS, Chicago, IL) e Graph Pad Prisma 4.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliações “in vivo”

#### 4.1.1 Parâmetros Hemodinâmicos

Os valores da FC e da PAM obtido pela mensuração direta da PA pulsátil intra-arterial estão demonstrados na Tabela 1.

Não se evidenciou diferenças com relação à FC entre os animais dos grupos sem doença periodontal, com doença periodontal e administração de veículo e com doença periodontal e administração de propranolol nas doses 0,1 e 5 mg/kg, bem como entre os animais que receberam propranolol nas doses 5 e 20 mg/kg de peso. Entretanto, os animais que receberam 20 mg/kg de propranolol apresentaram uma bradicardia superior aos animais sem doença periodontal e com doença periodontal e administração de veículo ( $P<0,001$ ) e aos animais que receberam a mesma droga na dose de 0,1 mg/kg de peso ( $P=0.004$ ) (Figura 1A).

Entre os animais sem doença periodontal e com doença periodontal e administração de veículo e propranolol 0,1 mg/kg, não se observou diferenças em relação a PAM, o que também ocorreu entre os animais com propranolol nas doses de 0,1 e 5 mg/kg de peso. Por outro lado, o grupo que recebeu 5 mg/kg de propranolol apresentou uma menor PAM quando comparados com o controle e salina ( $P<0,001$ ). Além do mais, os animais que receberam 20 mg/kg de propranolol apresentaram menores valores de PAM em relação aos demais grupos ( $P<0,001$ ) (Figura 1B).

Tabela 1 Valores médios ( $\pm$ epm) da FC e da PAM.

	Sem DP (n=4)	DP + veículo (n=4)	DP + Propranolol 0,1 mg/kg (n=4)	DP + Propranolol 5 mg/kg (n=4)	DP + Propranolol 20 mg/kg (n=4)
FC (bp)	345,8 $\pm$ 2,4	347,3 $\pm$ 2,2	338,1 $\pm$ 6,2	323,8 $\pm$ 5,0	302,6 $\pm$ 9,2 <sup>*#&amp;</sup>
PAM (mmHg)	104,9 $\pm$ 0,6	104,4 $\pm$ 0,3	102,6 $\pm$ 0,3	100,1 $\pm$ 0,8 <sup>*#</sup>	88,8 $\pm$ 0,5 <sup>*#&amp;§</sup>

FC = Frequência Cardíaca; PAM = Pressão Arterial Média. <sup>\*</sup> $P < 0,05$  vs. sem DP; <sup>#</sup> $P < 0,05$  vs. DP + veículo; <sup>&</sup> $P < 0,05$  vs. 0,1 mg/kg e <sup>§</sup> $P < 0,05$  vs. 5 mg/kg.

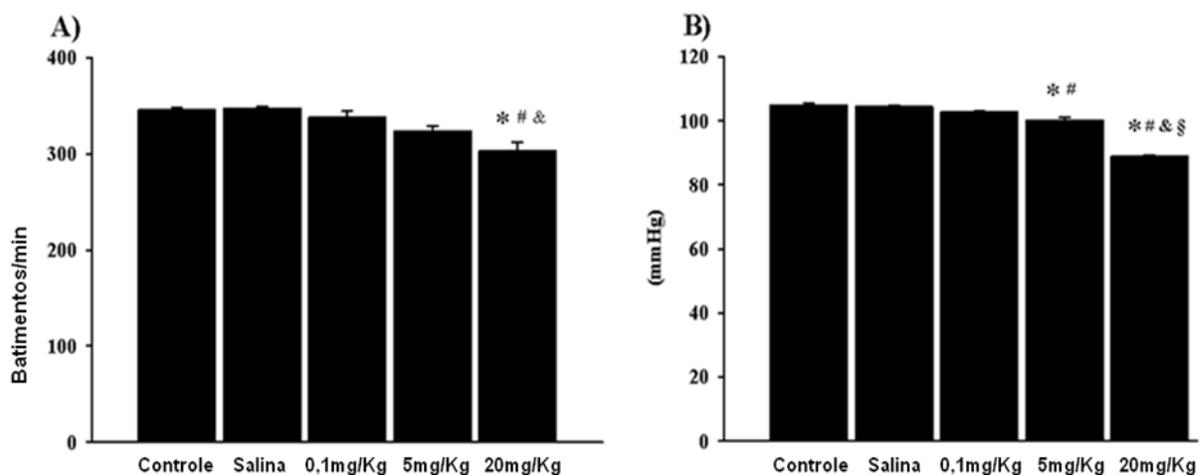


Figura 1: Parâmetros hemodinâmicos (A) Frequência cardíaca e (B) pressão arterial média. Dados em media  $\pm$  EPM. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs sem DP; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs DP + veículo; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs 0.1 mg/kg e <sup>§</sup> $P < 0.05$  vs 5 mg/kg.

Os parâmetros hemodinâmicos da Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE), dP/dT máxima e dP/dT mínima obtidos através da pressão intraventricular estão demonstrados na Tabela 2.

A PDFVE se apresentou indiferente entre os animais dos grupos sem doença periodontal e com doença periodontal, administração de veículo e

propranolol na dose de 0,1 mg/kg (Figura 2). Todavia, os animais que receberam 5 mg/kg de propranolol apresentaram uma PDFVE superior aos animais sem doença periodontal, com doença periodontal e administração de veículo e propranolol de 0,1 mg/kg ( $P<0,05$ ), o que também foi evidenciado ao comparar os animais que receberam 20 mg/kg de propranolol com os demais grupos ( $P<0,05$ ).

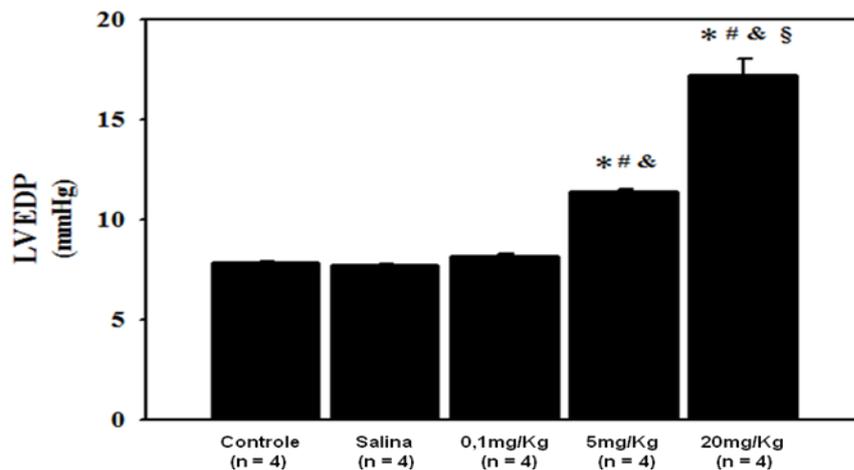
Em relação à velocidade máxima de contração do ventrículo esquerdo (dP/dT máxima), não se observou diferenças entre os animais sem doença periodontal, com doença periodontal e administração de veículo e 0,1 mg/kg de propranolol. Por outro lado, nota-se que os animais que receberam propranolol na dose de 5 mg/kg apresentaram um menor valor da dP/dT máxima quando comparados com os grupos sem doença periodontal e com doença periodontal e administração de veículo ( $P<0,05$ ), o que também foi evidenciado entre o grupo que recebeu 20 mg/kg de propranolol e os animais sem doença periodontal, com doença periodontal e administração de veículo e 0,1 mg/kg de propranolol ( $P<0,001$ ) e 5 mg/kg de propranolol ( $P=0,006$ ) (Figura 3).

Os animais que receberam 5 e 20 mg/kg de propranolol apresentaram uma velocidade máxima de relaxamento do ventrículo esquerdo (dP/dT mínima) significativamente menor em relação aos demais grupos ( $P<0,001$ ), o que não ocorreu entre os animais sem doença periodontal, com doença periodontal e administração de veículo e propranolol de 0,1 mg/kg (Figura 4).

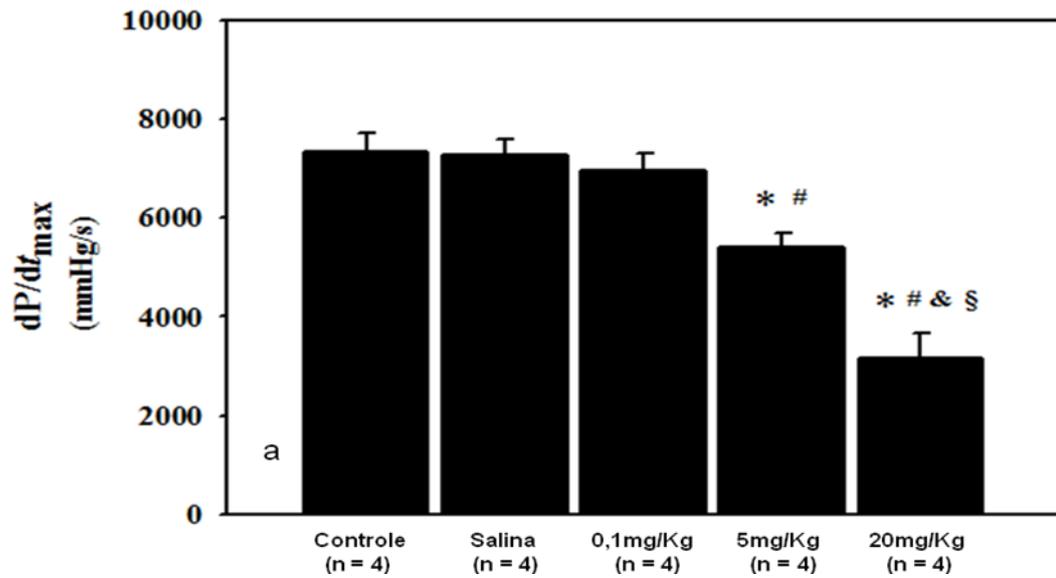
**Tabela 2** Valores médios ( $\pm$ epm) da PDFVE, dP/dT máxima e dP/dT mínima.

	Sem DP (n=4)	com DP + veículo (n=4)	DP + Propranolol 0,1 mg/kg (n=4)	DP + Propranolol 5 mg/kg (n=4)	DP + Propranolol 20 mg/kg (n=4)
PDFVE (mmHg)	7,82 $\pm$ 0,05	7,72 $\pm$ 0,03	8,17 $\pm$ 0,11	11,41 $\pm$ 0,10 <sup>*#&amp;</sup>	17,21 $\pm$ 0,85 <sup>*#&amp;§</sup>
dP/dT máxima (mmHg/s)	7331 $\pm$ 403	7281 $\pm$ 305	6959 $\pm$ 364	5418 $\pm$ 286 <sup>#</sup>	3155 $\pm$ 499 <sup>*#&amp;§</sup>
dP/dT mínima (mmHg/s)	-6435 $\pm$ 83	-6085 $\pm$ 77	-6121 $\pm$ 160	-4995 $\pm$ 60 <sup>*#&amp;</sup>	-2874 $\pm$ 146 <sup>*#&amp;§</sup>

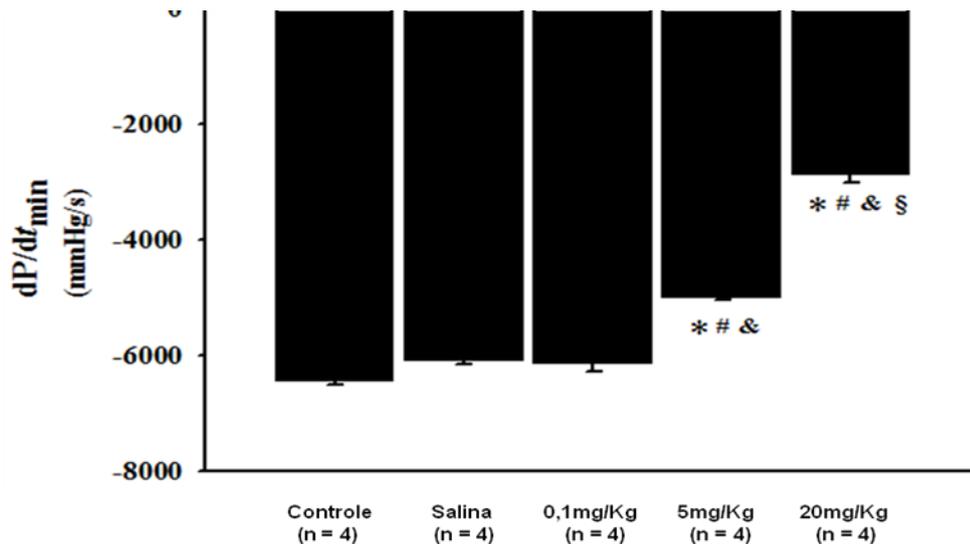
PDFVE = Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo; dP/dT máxima = Velocidade Máxima de Contração; dP/dT mínima = Velocidade Máxima de Relaxamento. \* $P < 0,05$  vs. sem DP; # $P < 0,05$  vs. com DP + veículo; & $P < 0,05$  vs. 0,1 mg/kg e § $P < 0,05$  vs. 5 mg/kg.



**Figura 2** Avaliação cardiovascular da pressão diastólica ventricular final esquerda. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs sem DP; #  $P < 0,05$  vs DP + veículo; &  $P < 0,05$  vs 0,1 mg / kg e §  $P < 0,05$  vs 5 mg / kg.



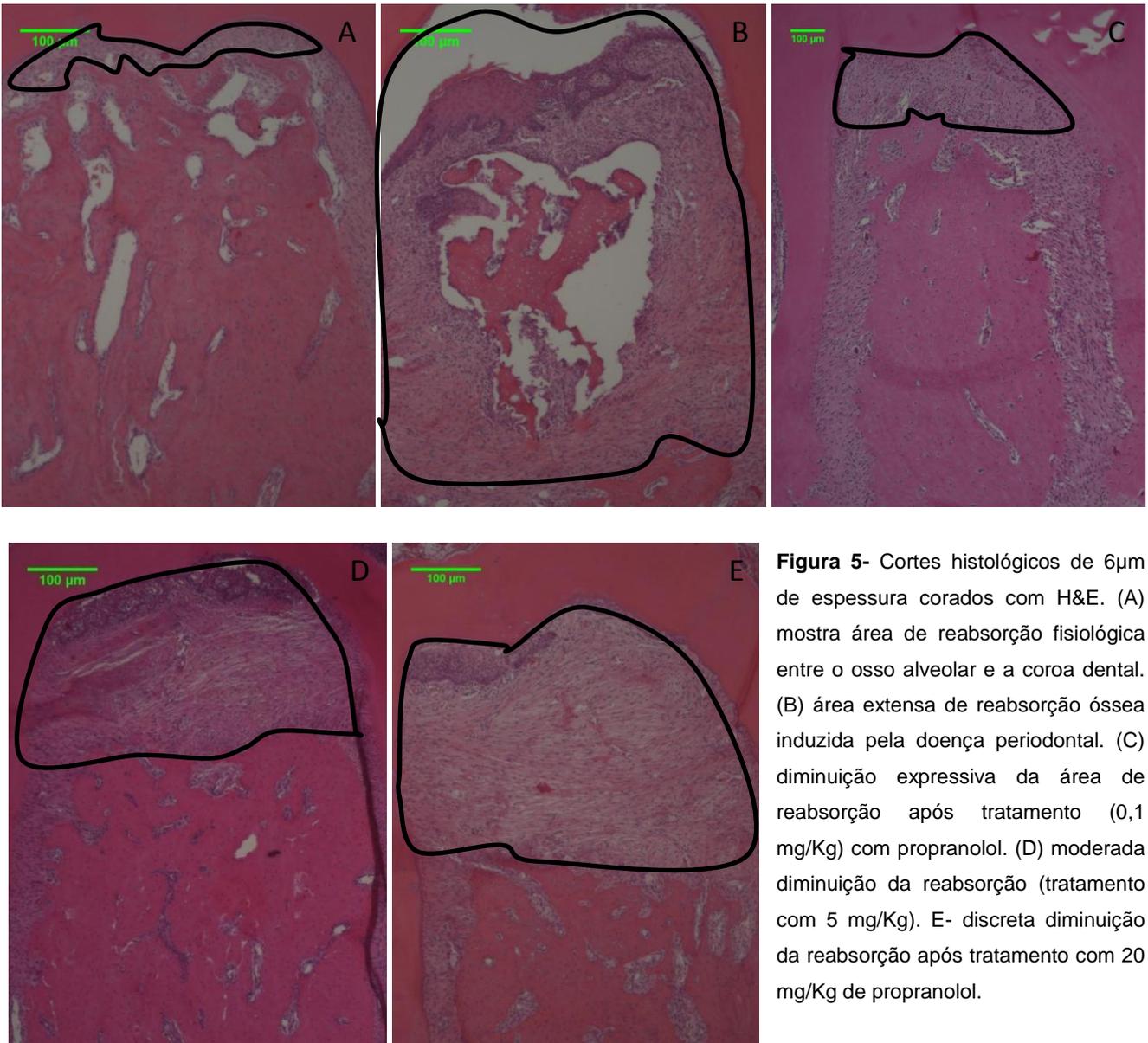
**Figura 3** Média de valores máximos da  $dP/dt_{max}$ . Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \* P <0,05 vs sem DP; # P <0,05 vs com DP + veículo; e P <0,05 vs 0,1 mg / kg e § P <0,05 vs 5 mg / kg.



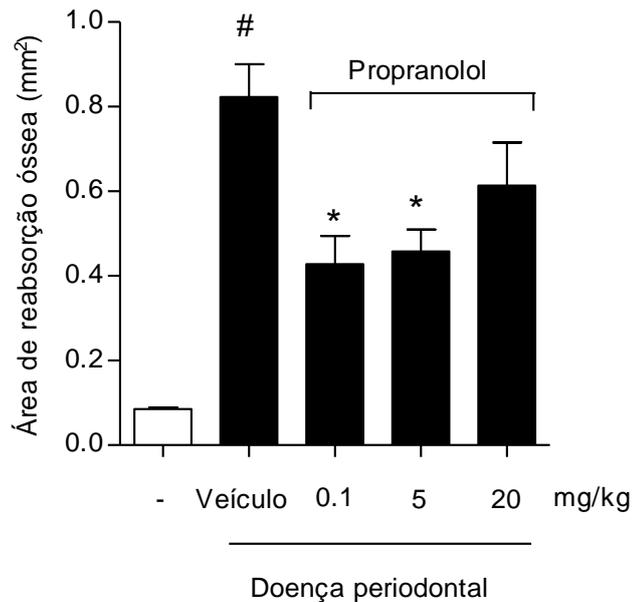
**Figura 4** Média de valores mínimos de  $dP/dt_{min}$ . Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. \* P <0,05 vs sem DP; # P <0,05 vs DP + veículo; & P <0,05 vs 0,1 mg / kg e § P <0,05 vs 5 mg / kg.

#### 4.1.2 Análise Histométrica da Reabsorção Óssea

Após a morte dos animais e o processamento histológico das mandíbulas, foram realizadas fotografias de todos os cortes histológicos dos 5 grupos estudados, a fim de mensurar a perda óssea induzida pela ligadura (Figura 5). Os animais que não foram submetidos a doença periodontal (média  $0,08 \text{ mm}^2 \pm 0,01$ ) (Figura 5A) não tiveram perda óssea comparada à aqueles que tiveram a doença induzida por intermédio da ligadura (média =  $0,82 \text{ mm}^2 \pm 0,34$ ) (Figura 5B) ( $P < 0,05$ ). Ficou demonstrado que entre estes animais, os que foram tratados com a solução de propranolol  $0,1 \text{ mg/kg}$  (média =  $0,43 \text{ mm}^2 \pm 0,23$ ) e  $5 \text{ mg/kg}$  (média =  $0,46 \text{ mm}^2 \pm 0,19$ ) (Figura 5C e D, respectivamente) reduziu a perda óssea estatisticamente ( $P < 0,05$ ) comparado com os animais que receberam a ligadura e nenhum tratamento ( $P < 0,05$ ). Os animais que receberam doses de  $20 \text{ mg/kg}$  (média =  $0,61 \text{ mm}^2 \pm 0,20$ ) (Figura 5E) não impediram a perda óssea estatisticamente significativa se comparado ao grupo com doença periodontal e sem tratamento. As mensurações da perda óssea intraradicular dos grupos estudados estão apresentados na Figura 6.



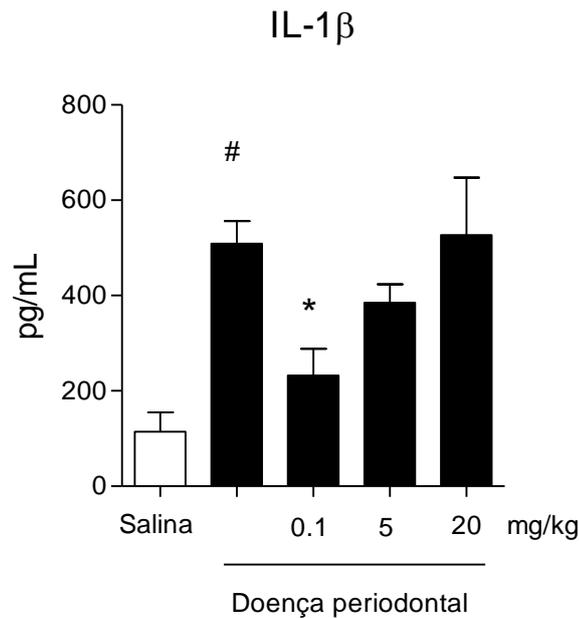
**Figura 5-** Cortes histológicos de 6µm de espessura corados com H&E. (A) mostra área de reabsorção fisiológica entre o osso alveolar e a coroa dental. (B) área extensa de reabsorção óssea induzida pela doença periodontal. (C) diminuição expressiva da área de reabsorção após tratamento (0,1 mg/Kg) com propranolol. (D) moderada diminuição da reabsorção (tratamento com 5 mg/Kg). E- discreta diminuição da reabsorção após tratamento com 20 mg/Kg de propranolol.



**Figura 6** Área de reabsorção óssea, segundo os grupos,  $p < 0,05$  (ANOVA seguido de Bonferroni).

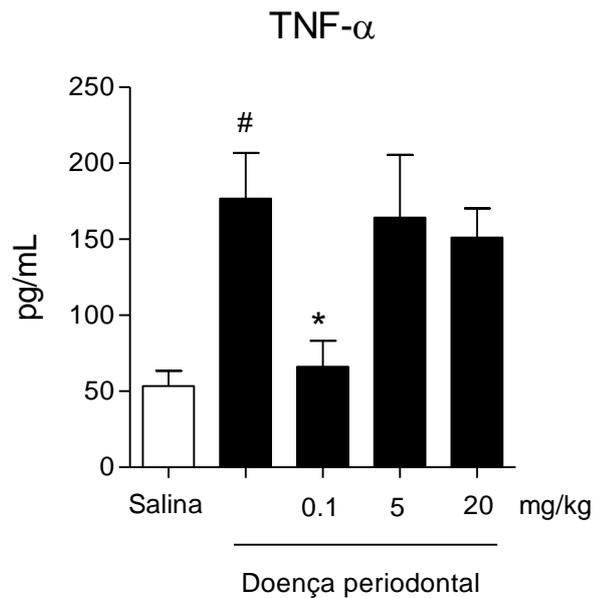
#### 4.1.3 Quantificação das Citocinas (IL-1 $\beta$ E Tnf- $\alpha$ ) do Tecido Gengival por ELISA

A concentração obtida de IL-1 $\beta$  (pg/mg) do tecido gengival no grupo de animais com doença periodontal tratados com veículo, foi estatisticamente maior que os níveis encontrados em animais sem doença periodontal ( $p < 0,05$ ). No entanto não houve progressão da doença apenas no grupo que recebeu 0,1 mg/Kg de propranolol (Figura 7). O grupo de animais que recebeu a dose de 5 mg/kg também foi notada uma diminuição desta citocina; no entanto não significativa. Porém, o grupo com 20 mg/kg, os níveis de IL-1 $\beta$  apresentaram semelhantes ao grupo com doença periodontal (Figura 7).



**Figura 7:** Concentração de IL-1 $\beta$  nos grupos tratados com diferentes concentrações de propranolol após indução da doença periodontal. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. O símbolo # demonstra diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem doença periodontal e o grupo com doença periodontal e tratado com veículo. O símbolo \* indica diferença estatística entre o grupo com doença periodontal e tratado com veículo e os animais com doença periodontal e tratados com propranolol 0,1 mg/kg. (ANOVA seguido de Bonferroni).

Com relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , foi observado aumento dos níveis no tecido gengival nos animais com doença periodontal quando comparado ao grupo sem doença ( $p < 0,05$ ). Quando comparado os grupos de animais com doença porém que receberam tratamento com propranolol, apenas o grupo de animais que recebeu a dose de 0,1 mg/kg apresentou queda estatisticamente significativa em relação ao grupo de animais com doença periodontal e tratados com veículo ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com 5 e 20 mg/kg apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  próximos ao do grupo com doença periodontal e tratado com veículo (Figura 8).

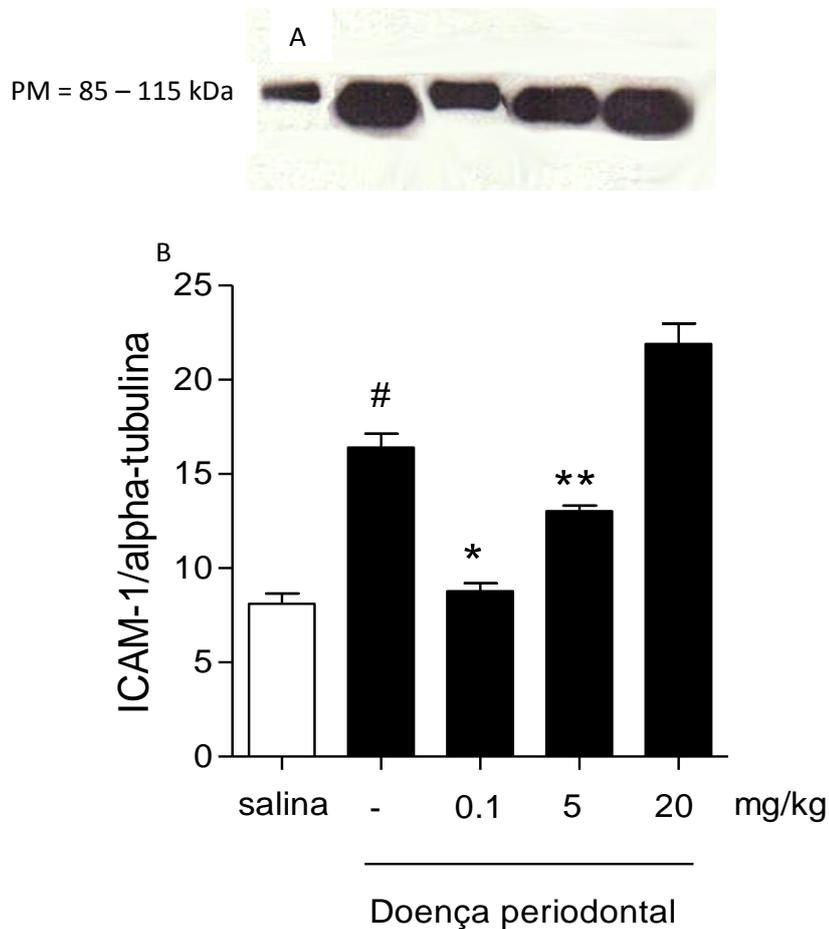


**Figura 8:** Concentração de TNF- $\alpha$  nos grupos tratados com diferentes concentrações de propranolol após indução da doença periodontal. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. O símbolo # demonstra diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem doença periodontal e o grupo com doença periodontal e tratado com veículo. O símbolo \* indica diferença estatística entre o grupo com doença periodontal e tratado com veículo e os animais com doença periodontal e tratados com propranolol 0,1 mg/kg. (ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.1.4 Quantificação de ICAM-1 e RANKL no Tecido Gengival

Quanto à expressão de ICAM-1 no tecido gengival (Figura 9) pode-se observar uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da mesma nos grupos que receberam as doses de 0,1 mg/kg e 5 mg/kg. Entretanto, o grupo de animais tratados com 5 mg/kg, apresentou diferença estatística em comparação com o grupo de 0,1 mg/kg ( $p < 0,05$ ), demonstrando uma melhor efetividade na diminuição da expressão da dose de 0,1 mg/kg. Importante, não houve diferença na expressão de ICAM-1 entre os grupos de animais sem doença e com doença tratados com a dose de 0,1 mg/kg. Por outro lado o grupo que recebeu uma alta dosagem (20 mg/kg) foi

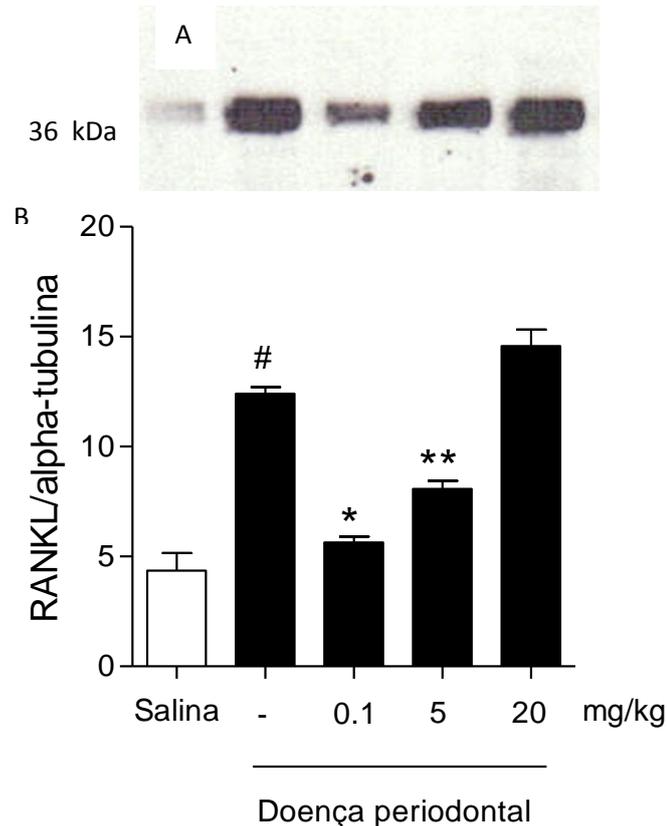
observado um aumento na expressão de ICAM-1 em relação ao grupo de animais com doença periodontal e tratados com veículo.



**Figura 9** Expressão de ICAM-1 no tecido gengival detectado por Western blot (A). Comparação da expressão de ICAM-1 no tecido gengival (b). Pode-se observar que não existe diferença estatística do grupo que recebeu 0,1mg/Kg da droga com o grupo controle-salina ( $p > 0,05$ ) e uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos (controle DP-salina e tratados - 5mg/Kg e 20mg/kg)-  $p < 0,05$  (ANOVA - seguido de Bonferroni).

Quanto à expressão de RANKL no tecido gengival (Figura 10) pode-se observar que o grupo de animais nos quais foi induzido a doença periodontal, há uma intensa expressão de RANKL estatisticamente significativa se comparado ao grupo de animais sem doença ( $p < 0,05$ ). Além disso, dentre os animais com doença periodontal e que receberam propranolol, os grupos de 0,1 ou 5 mg/kg apresentaram diminuição da expressão de RANKL estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo de doença periodontal e tratado com veículo. Porém, o grupo de animais

tratados com 5 mg/kg, teve uma expressão maior estatisticamente significativa em comparação com o grupo de 0,1 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Os animais tratados com 20 mg/kg de propranolol apresentaram uma expressão de RANKL semelhante ao grupo com doença periodontal e tratado com veículo.



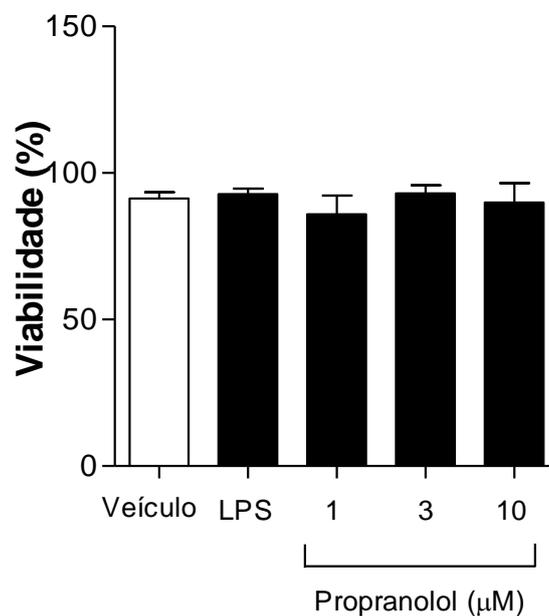
**Figura 10** Expressão de RANKL no tecido gengival detectado por Western blot (A). Comparação da expressão de RANKL no tecido gengival (B). Podendo observar uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de RANKL no grupo 0,1mg/Kg quando comparado com o grupo DP-salina, não havendo uma diferença estatística com o grupo controle salina ( $p > 0,05$ ). (ANOVA seguido de Bonferroni).

## 4.2 Avaliações “in vitro”:

### 4.2.1 Viabilidade celular

Após a observação de que o propranolol impede a reabsorção óssea inter-radicular *in vivo*, testamos os efeitos desta droga em cultura de osteoclastos a fim de elucidar os mecanismos de ação.

Inicialmente, testamos se as doses escolhidas para o uso *in vitro* (1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ) possuem algum tipo de citotoxicidade nas células. Pode-se observar que nenhuma das três doses testadas, assim como o LPS utilizado para estimular as células, induziu a morte celular significativa destas células. A viabilidade (%) foi de aproximadamente 95% para todos os grupos testados (Figura 11).

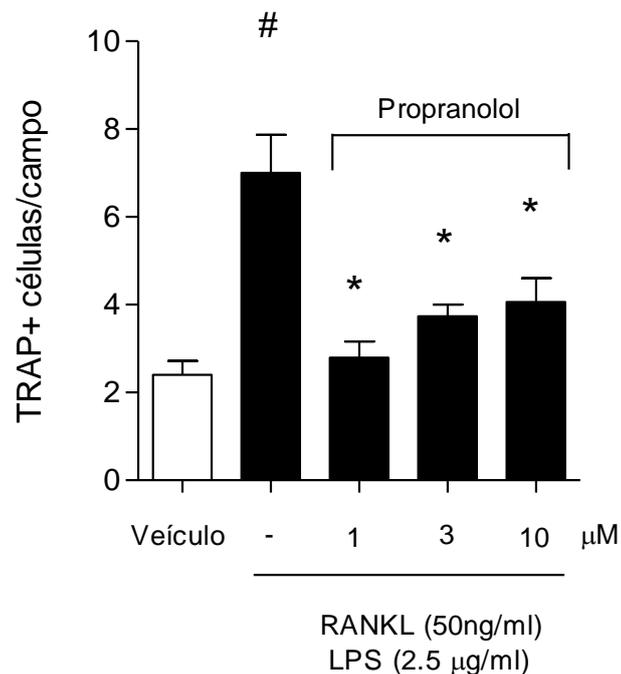


**Figura 11** Comparação da viabilidade celular (%). Não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ -ANOVA – seguido de Bonferroni).

#### 4.2.2 Potencial Inibitório da Osteoclastogênese induzida pelo Propranolol

Após o tempo de incubação para o desenvolvimento da cultura celular na presença ou não de propranolol, foi realizada a coloração para fosfatase ácida (TRAP). As células diferenciadas multinucleadas coradas em vermelho-escuro foram contadas com o auxílio de um microscópio de luz. Na presença de RANKL e LPS, foi

possível observar um grande número de células osteoclásticas maduras e multinucleadas, estatisticamente significante se comparado ao grupo que não foi estimulado ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, as células tratadas com as 3 doses de propranolol demonstraram inibição da diferenciação de osteoclastos ( $p < 0,05$ ). Apesar de todas as doses terem sido efetivas, a dose de 1  $\mu\text{M}$  teve a melhor efetividade como demonstrado na Figura 12.

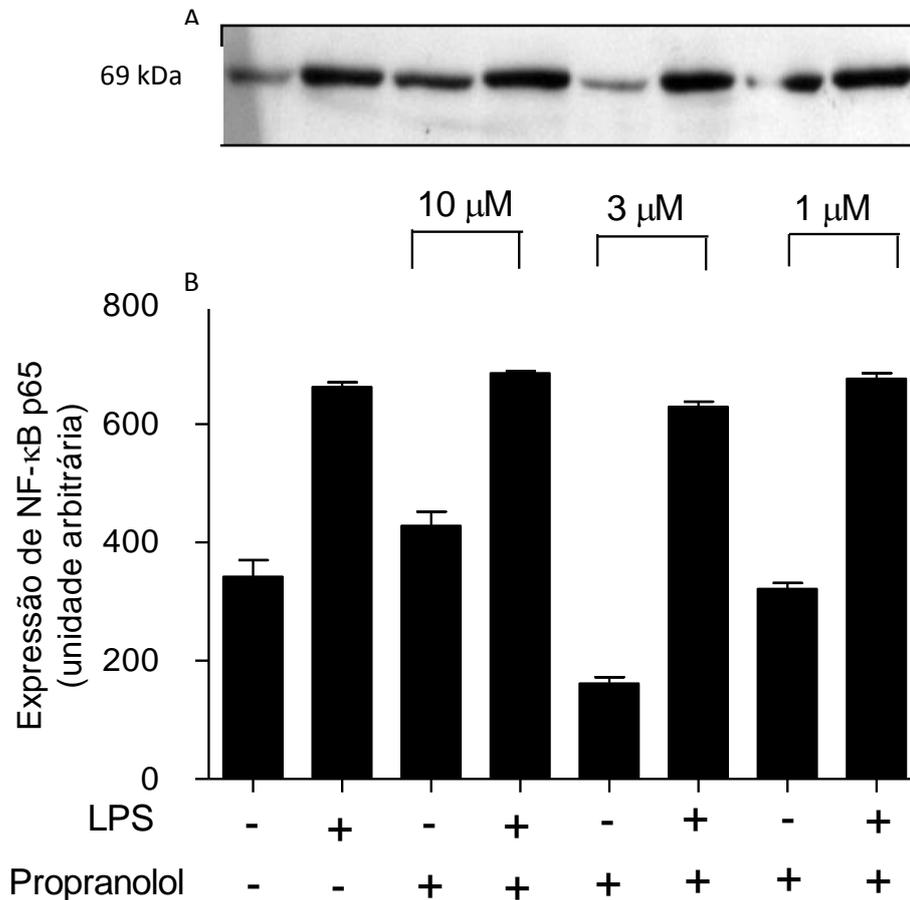


**Figura 12** Comparação da expressão de TRAP+células/campo em diferentes concentrações de propranolol (1,3 e 10 $\mu\text{M}$ ). Havendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (ANOVA, seguido de Bonferroni).

#### 4.2.3 Expressão de NF- $\kappa\text{B}$ e NFTA $\text{c}$ em células osteoclásticas

Com o objetivo de compreender os efeitos do propranolol na sinalização intracelular dos osteoclastos, após o período de incubação das células (4 dias) foram extraídas as proteínas para avaliação por *western blot*. A expressão de NF- $\kappa\text{B}$  foi comparada entre grupos que receberam as três concentrações da droga (propranolol) na presença ou não de LPS (Figura 13). As células na presença de LPS apresentaram um aumento significativo da expressão do NF- $\kappa\text{B}$ , se comparado

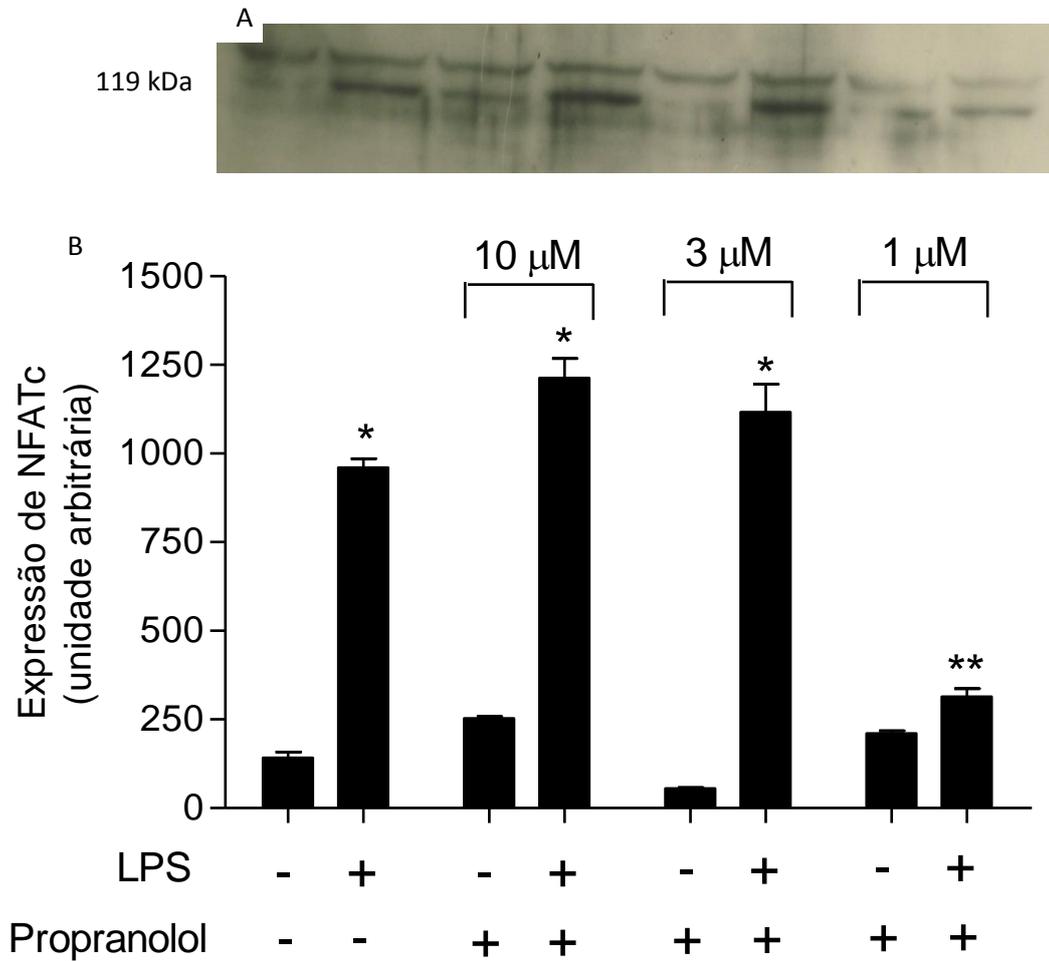
às células apenas em meio de cultura e aquelas a qual foi adicionado apenas o propranolol. Além disso, a expressão do NF- $\kappa$ B das células tratadas com as três concentrações (1, 3 e 10  $\mu$ M) e ativadas com LPS, não sofreu alteração significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13** Expressão de NF- $\kappa$ B em cultura de osteoclastos (A), após inserção de três concentrações (1, 3 e 10  $\mu$ M) de propranolol + LPS e sem LPS. Não se observou diferenças entre os grupos estimulados (LPS) + droga (propranolol)  $p > 0,05$  (ANOVA, seguido de Bonferroni (B)).

A expressão de NFATc foi comparada entre grupos que receberam 3 concentrações da droga (propranolol) mais LPS e sem LPS, também controles somente com LPS e somente o meio de cultura (Figura 14). Pode-se notar que as células incubadas na presença de LPS há um aumento significativo na expressão do NFAT-c quando comparado às células incubadas apenas com meio ou propranolol

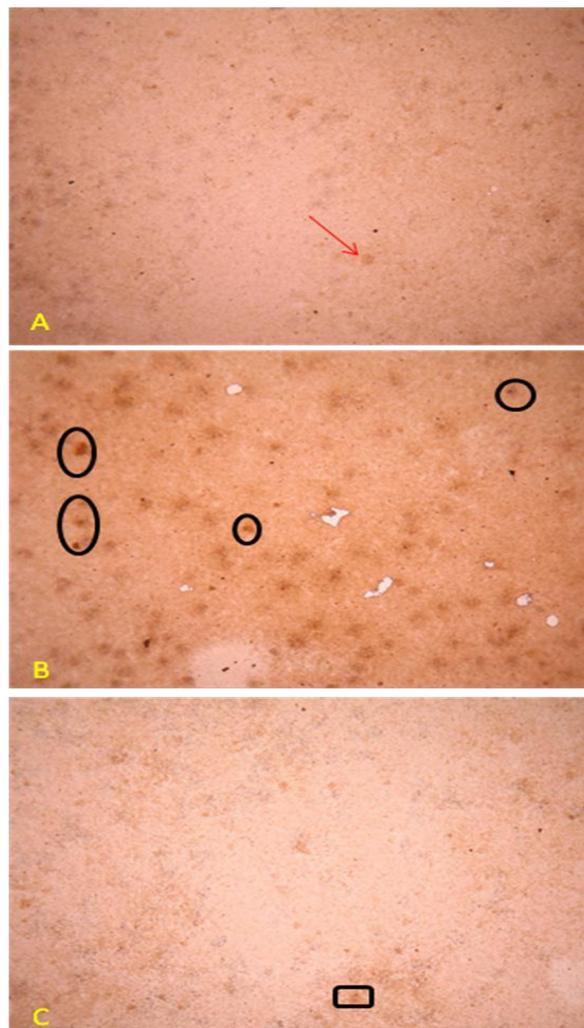
nas diferentes doses ( $p < 0,05$ ). Interessante, apenas as células estimuladas com LPS e tratadas com a dose de 1 $\mu$ M foi capaz de inibir a expressão do NFATc ( $p < 0,05$ ).



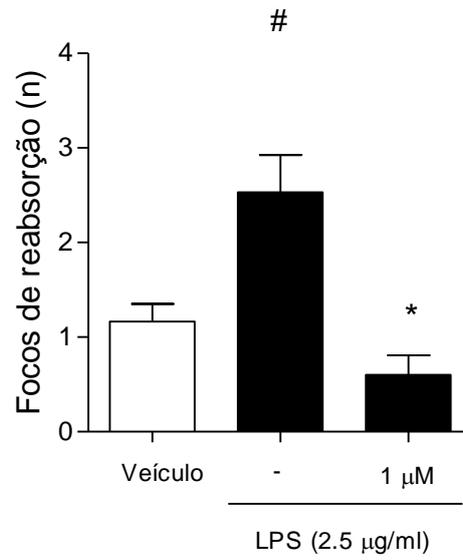
**Figura 14** Expressão de NFATc em cultura de osteoclastos (A). Comparação dos níveis de expressão de NFATc em cultura de células após estímulo com LPS associado a três distintas concentrações de propranolol (2, 3 e 10 $\mu$ M), bem como grupos que recebeu somente a droga, LPS ou que não recebeu ambos (B). Havendo uma redução expressiva ( $p < 0,05$ ) nos níveis de NFATc no grupo que recebeu o propranolol na concentração de 1 $\mu$ M estimulado com LPS, quando comparado com os demais grupos (droga + LPS) (ANOVA, seguido de Bonferroni).

#### 4.2.4 Reabsorção Óssea (Osteologic®)

A capacidade resorptiva dos osteoclastos foi avaliada após incubação das células no Bio Coat Osteologic System (BD). A formação de pontos escuros (Figura 15) nesta camada indica a atividade resorptiva das células. A fim de determinar se na dose de 1 $\mu$ M de propranolol as células osteoclásticas tem sua atividade diminuída, as células foram então estimuladas com LPS na presença ou não de propranolol. Foi possível observar um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) de pontos de reabsorção no grupo tratado com 1 $\mu$ M de propranolol em relação ao grupo que não recebeu a droga conforme visualizado na Figura 16.



**Figura 15** (A) Seta demonstra ponto escuro, característico de reabsorção óssea, sendo poucas áreas. (B) Círculos demonstram vários pontos escuros; acentuada reabsorção óssea. (C) Retângulo apresenta ponto de reabsorção, poucas áreas de reabsorção.



**Figura 16** Representa focos de reabsorção óssea em discos de dentina, comparado com grupo que recebeu 1µM de droga e grupo que não recebeu a droga, no entanto ambos receberam LPS. Havendo portanto diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) com redução de focos de reabsorção no grupo que recebeu a droga (ANOVA, seguido de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram um forte envolvimento da atividade do sistema nervoso simpático na regulação da massa óssea, através da estimulação de reabsorção óssea, a partir de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, uma vez que o grupo doença periodontal que não recebeu antagonista  $\beta$ -adrenérgico mostrou uma diferença considerável na perda de massa óssea em relação ao grupo que recebeu uma baixa e intermediária dose, sendo correlacionado em trabalhos anteriores (TAKEDA *et al.*, 2002; ELEFTERIOU *et al.*, 2005) o envolvimento do sistema nervoso simpático na regulação do metabolismo ósseo, uma vez que células do sistema imune humanas expressam na superfície celular receptores adrenérgicos (TOGARI *et al.*, 1997; TOGARI *et al.*, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que a diminuição da formação óssea é dependente da ativação de receptores  $\beta$  2-adrenérgicos, uma vez que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos também são expresso por osteoblastos (TOGARI *et al.* 1997). Em nosso estudo, os grupos tratados com baixas doses de propranolol (0,1 e 5 mg / kg) responderam com uma menor reabsorção óssea inter radicular. Curiosamente, os estudos farmacológicos sobre os receptores adrenérgicos apresentaram resultados controversos. No entanto, o efeito benéfico do propranolol na formação óssea foi demonstrado previamente em ratos cirurgicamente fraturados em que, após nove semanas, período de tratamento com propranolol (0,1 mg / kg / dia), induziu um aumento na taxa de deposição mineral na metáfise e uma taxa de aumento da formação óssea, tanto no perióstio e endóstio (MINKOWITZ *et al.* 1991).

ELENKOV *et al.* (2000) apresentaram fortes indícios de que o sistema nervoso central não só recebe as mensagens do sistema imunológico, mas também modula a função imune. O sistema nervoso simpático, sendo parte do sistema nervoso autônomo, tem demonstrado ser uma interface de integração entre os dois sistemas (BEDOUI *et al.* 2003;. HAUG & HEYERAAS 2006). Além do mais, Okada *et al.* (2010) investigaram os efeitos do propranolol sobre a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *Porphyromonas gingivalis*, para analisar o envolvimento da inervação simpática na destruição periodontal experimental, constatando através da medição da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar

(Coloração de H&E) e a atividade da fosfatase ácida tartarato resistente, que após o bloqueio competitivo do uso do propranolol, inibiu a diferenciação dos osteoclastos e impediu a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *P. gingivalis*. No mesmo estudo, em análise histológica, revelou que o número de osteoclastos detectados foi proporcional ao nível de perda óssea; no entanto o trabalho, não evidenciou um possível mecanismo para tal diferença, uma vez que as células do sistema imune participantes do processo de reabsorção possuem vários fatores transcricionais envolvidos na expressão e ativação celular (CAO *et al.*, 2010).

Em nosso estudo foi possível constatar os possíveis mecanismos pelos quais baixa dose de propranolol é terapeuticamente eficiente para evitar a reabsorção óssea periodontal. Em oposição, Reid *et al.*, (2005) demonstraram através de um estudo randomizado com mulheres (n = 41) no período pós-menopausa, após serem tratadas com propranolol (160mg/dia e placebo) durante 3 meses, um decréscimo de osteocalcina no soro de quase 20% já nas duas semanas iniciais, sendo aumentado o efeito ao longo do tempo (p = 0,0001). Porém, não foi observada neste mesmo estudo, diminuição de outros marcadores de osteoclastos, como pró-colágeno tipo I e atividade da fosfatase alcalina, sendo desvinculada uma ação benéfica de antagonista  $\beta_2$  no tratamento da osteoporose. Ainda, observações recentes mostraram que o propranolol é incapaz de resgatar a perda óssea em ratos adultos ovariectomizadas (PIERROZ *et al.* 2006). Nossos dados corroboram com informações de Takeda *et al.*, (2002) que demonstraram que a ação de um antagonista  $\beta_2$  (propranolol) é capaz de aumentar a massa óssea em camundongos. Do mesmo modo, Bonnet *et al.* (2005) avaliaram a massa óssea, a resistência e a microarquitetura em ratas (n = 39) tratadas por seis semanas com agonistas de receptores  $\beta_2$  (Salbutamol e Clenbuterol) ou salina, sendo observado nos grupos tratados com agonista  $\beta_2$  uma diminuição significativa de minerais e um decréscimo no comprimento e largura cortical femural, quando comparado com o controle salina, sendo mais afetado o grupo que recebeu Clenbuterol na avaliação da resistência óssea e na microarquitetura quando comparado com o Salbutamol. Em continuidade, Bonnet *et al.*, (2008), utilizando ratas fêmeas, ovariectomizadas e não ovariectomizadas e após tratamento com propranolol em doses baixas (0,1 mg/kg), intermediária (5mg/Kg) e alta (20mg/Kg), mostraram que baixas doses de  $\beta$ -bloqueadores podem ter uma utilidade terapêutica no tratamento da osteoporose

com alta seletividade para o tecido ósseo, sem alterações cardíacas, corroborando com os nossos resultados em relação com doenças ósseo periodontais.

Assim, sugerimos que os efeitos em baixa dose de  $\beta$ -bloqueadores nos ossos são parcialmente devida à inibição de marcadores inflamatórios e osteoclastogênese, sem afetar as funções cardíacas.

A perda óssea ocorre em resposta a uma reação inflamatória que é hoje conhecida por depender de dois fatores críticos (GRAVES, 2003), o primeiro, a concentração dos mediadores inflamatórios presentes no tecido gengival deve ser suficiente para ativar vias que levam à reabsorção óssea e em segundo lugar, os mediadores inflamatórios deve penetrar no tecido gengival para alcançar uma distância crítica em relação ao osso alveolar.

Atingir concentrações críticas de mediadores inflamatórios que levam à reabsorção óssea depende da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-11 e IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) fator inibitório de leucemia, e oncostatina-M (LERNER, 2006). As cininas, tais como bradicinina, calidina, trombina e várias quimiocinas também tem um efeito estimulante sobre a reabsorção óssea (LERNER, 2006). Este é o oposto da expressão de citocinas anti-inflamatórias e de outros mediadores, como IL-4, 10, 12, 13 e 18, bem como interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e gama (IFN- $\gamma$ ), que servem para inibir a reabsorção óssea (LERNER, 2006). Citocinas pró-inflamatórias que são essenciais para a propagação da resposta inflamatória à região proximal ao osso, sendo demonstrado em um estudo (ASSUMA *et al.*, 1998) utilizando um modelo primata (*Macaca fascicularis*) de periodontite experimental. Primatas receberam injeções locais, durante um período de seis semanas, de antagonistas de TNF- $\alpha$  e IL-1 ou veículo (grupo controle). Análise das seções do tecido conjuntivo gengival na proximidade do osso demonstrou o recrutamento de células inflamatórias e significativa formação de osteoclastos do osso adjacente; nos primatas controle. Os antagonistas de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 reduziu o aparecimento de células inflamatórias na região e a formação de reabsorção óssea por osteoclastos. Injeção desses antagonistas reduziu recrutamento de células inflamatórias em 80%, a formação de osteoclastos em 67%, e a perda óssea em 60% em relação ao controle locais (P <0,01) (ASSUMA *et al.*, 1998). A inibição de mediadores inflamatórios pode

prevenir, o acometimento do osso alveolar, sendo associado com uma redução na perda óssea (COCHRAN, 2008).

Assim, nossos dados sugerem que o efeito de anti-inflamatórios *in vivo* de propranolol pode ser pela inibição pró-inflamatórias de síntese de citocinas inflamatórias nos locais que por sua vez, inibem a interação de leucócitos com células endoteliais devido à menor expressão de ICAM-1, que foi confirmado pelos nossos resultados a partir do tecido gengival. De nosso conhecimento, esta é a primeira evidência que mostra esse mecanismo de ação no tecido periodontal. Além disso, a noradrenalina *in vivo* e *in vitro*, inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (VAN DER POLL *et al.*, 1996; HASKO *et al.*, 1998), sugerindo que o sistema nervoso simpático pode alterar o equilíbrio Th1/Th2, deslocando-o de uma atividade pró-inflamatórias (resposta Th1) para uma resposta anti-inflamatória (Th2) (WOICIECHOWSKY *et al* 1998.; ELENKOV & CHROUSOS 1999).

Outro mecanismo pelo qual a baixa dose de propranolol inibe a reabsorção óssea se deve à inibição da osteoclastogênese. A ativação de  $\beta$ -adrenérgicos aumenta a expressão de RANKL e leva à estimulação da diferenciação dos osteoclastos na medula óssea de camundongos (TAKEUCHI *et al.* 2001). Além disso, a ativação de osteoblastos podem induzir a expressão de citocinas (IL-6, IL-11 e da prostaglandina E2), que atuantes no sítio ósseo, o que aumenta a osteoclastogênese (KONDO *et al.* 2001;. KONDO & TOGARI, 2003). Além disso, altera os níveis de expressão de uma proteína chamada receptor ativador do ligante fator nuclear kappa B (RANKL) na superfície dos osteoblastos (LERNER, 2006; BOYLE *et al.*, 2003). RANKL liga-se a precursores de OCL e ativa fatores de transcrição (KIM *et al.*, 2000), resultando na ativação de várias vias de sinalização, inclusive os complexos IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$  e NIK-IKK $\alpha$ ) e MAPKs (ERK1 / 2, p38 e JNK) (YAVROPOULOU & YOVOS, 2008; ASAGIRI & TAKAYANAGI, 2007; BOYLE *et al.*, 2003), o que leva à ativação de fatores de transcrição essenciais, como o NF-kB e c-Fos. A ativação de NF-kB e c-Fos por RANKL induz uma inicial expressão de fator transcricional do NFATc1, que é ativado pela fosfatase calcineurina Ca<sup>2</sup> / calmodulina-regulado (ASAGIRI & TAKAYANAGI, 2007; HOGAN *et al.*, 2003; ISHIDA *et al.*, 2002). Eventualmente, ocorre a sinalização do cálcio e ativa o NFATc1, o que desencadeia autoamplificação de NFATc1 (ASAGIRI &

TAKAYANAGI, 2007; SHINOHARA & TAKAYANAGI, 2007), processo este exigido para a diferenciação OCL.

A ligação do RANKL ao RANK na presença de fator estimulante de colônias de macrófagos induz a diferenciação dos preosteoclastos em uma célula multinucleada que se torna uma célula adulta denominada osteoclasto (BARSHAVIT, 2007). É uma célula polarizada que passa por mudanças estruturais que lhe permitam formar uma junção perfeita entre a superfície do osso e membrana basal, mas que também secretam enzimas líticas capazes de consumir estruturas osseas subjacentes (BOYLE, 2003).

De acordo com nossos resultados, a baixa dose de propranolol diminuiu significativamente a expressão de RANKL no tecido gengival. Este resultado é apoiado por dados anteriores de que o propranolol inibiu a expressão de mRNA em osteoblastos humanos, sugerindo que  $\beta$ -adrenérgicos podem desempenhar um papel na modulação da remodelação óssea pelo sistema nervoso simpático (HUANG *et al.*, 2009).

Além disso, observou-se baixas doses de propranolol *in vitro* é capaz de diminuir a diferenciação dos osteoclastos, bem como a sua atividade (ensaio osteológicos). Em humanos, osteoclastos multinucleados expressam constitutivamente  $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 2B, e  $\beta$ 2-adrenoreceptores. Além disso,  $\beta$ -agonistas regula a expressão de marcadores característicos dos osteoclastos maduros, como a integrina, anidrase carbônica, catepsina K e aumento da reabsorção óssea osteoclástica atividade (ARAI *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que os agonistas  $\beta$ -adrenérgicos estimulam diretamente a atividade de reabsorção óssea em osteoclastos maduros, dando assim suporte aos resultados. Nós ainda analisamos a via intracelular das células dos osteoclastos para uma melhor compreensão deste processo.

O papel essencial da NF- $\kappa$ B na ativação e diferenciação de osteoclastos foi demonstrada geneticamente. NF- $\kappa$ B p50 e p52 camundongos duplamente deficientes desenvolvem osteopetrose severa devido a um defeito na osteoclastogênese (FRANZOSO *et al.*, 1998, IOTSOVA *et al.*, 1997). Apesar de sua importância reconhecida da NF- $\kappa$ B na osteoclastogênese, de acordo com nossos resultados, o efeito inibitório do propranolol se faz por esta via. Por outro parece ser pela inibição de NFATc1, um importante fator transcricional na ativação de osteoclasto.



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos podemos concluir que a inibição dos receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos pelo uso de um antagonista não seletivo (propranolol) em baixas concentrações, sugere um importante papel na imunomodulação e controle dos efeitos deletérios na doença periodontal experimental, comprovada pela diminuição de reabsorção óssea, de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão no tecido gengival, sem alterações cardíacas, e também possui um efeito inibitório da osteoclastogenese *in vitro* sem interferir na viabilidade celular. Portanto, o propranolol em baixas concentrações não altera parâmetros hemodinâmicos, como a frequência cardíaca e pressão arterial média, se comparando com animais controles. Por outro lado animais que receberam uma dose intermediária de propranolol possuem uma menor PAM quando se compara com o grupo controle. Já os animais que recebem uma dose alta da droga apresentam uma bradicardia superior aos demais grupos.

O bloqueio de adrenoreceptores  $\beta$ -adrenérgicos em doses baixas e intermediária é capaz de diminuir a reabsorção óssea após indução da doença periodontal, tendo uma menor área de reabsorção inter-radicular na avaliação histométrica. O mesmo não ocorre em animais tratados com alta dose de propranolol, uma vez que se observa intensa área de reabsorção pelo processo inflamatório.

Animais que foram tratados com antagonista  $\beta$ 2-adrenérgico de maneira dose dependente possuem uma menor expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido gengival avaliado por teste de ELISA sugerindo um favorecimento da modulação da resposta Th1 envolvida na patogênese da doença periodontal

Há uma menor expressão de proteínas de adesão (ICAM-1) e ativadoras de receptores RANK (RANKL) no triturado gengival em animais sob terapêutica com concentrações baixas de propranolol, favorecendo a uma menor migração celular e a uma diminuição de macrófagos ativados no osso alveolar.

Não há evidências que o uso do propranolol altere os níveis de expressão de NF- $\kappa$ B em cultura de osteoclastos, sendo suportada a hipótese nula de averiguação de diminuição da NF- $\kappa$ B com o uso de propranolol. No entanto, a

utilização da droga consegue diminuir expressivamente a expressão de NFATc em cultura, sugerindo um possível mecanismo de bloqueio na ativação pelo cálcio ou atuação da calcineurina ou calmodulina, havendo necessidade de novos estudos.

O uso do propranolol em diferentes concentrações (baixa, intermediária e alta) não altera a viabilidade celular *in vitro*.

O propranolol inibe a osteoclastogênese após indução de diferenciação celular em cultura de células.

Existe um potencial inibitório da atividade osteoclástica (avaliada com o Kit "osteologic" quando se utiliza bloqueador  $\beta$ 2-adrenergico).

Em conclusão, os dados indicam que a baixa dose de propranolol pode suprimir a reabsorção óssea periodontal por osteoclastogênese mediada por RANKL, inibindo assim os marcadores inflamatórios, sem afetar os parâmetros hemodinâmicos.

## REFERÊNCIAS

ALBANAR, J. M., BRUNELLE, J. A., KINGMAN, A. Descriptive periodontal disease in adults 30 years of age older in the United States, 1988, 1994. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 70, p. 13-29, 1999.

ALBANAR, J. M. Global risk factors and indicators for periodontal diseases. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 29, p. 122-152, 2002.

ALBANESI, F. F. Insuficiência cardíaca no Brasil. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 71, p. 561-562, 1998.

ARAI, M. et al. Effects of adrenergic agonist on bone resorbing activity in human osteoclast like cells. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1640, p. 137-142, 2003.

ARCH, J. R. S. **Proc Nutr Soc**, [S.l.], v. 48, p. 215, 1989.

ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**, New York, US, v. 40, p. 251-264, 2007.

ASSUMA, R. et al. IL 1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol**, Baltimore, Md., US, v. 160, p. 403-409, 1998.

BAELUM, V. et al. Periodontal conditions among in adults Southern Thailand. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 38, p. 156-163, 2003.

BASTOS, M. F. et al. Hypertension may affect tooth supporting alveolar bone quality: a study in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, US, v. 81, p. 1075-1083, 2010.

BATLOUNI, M.; ALBUQUERQUE, D. C. Bloqueadores beta adrenergéticos da insuficiência cardíaca. **Arq Bras Cardiol**. São Paulo, v. 74, n. 4, p. 339-349, 2000.

BEDOUI, S. et al. Relevance of neuropeptide y for the neuroimmune crosstalk. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 134, p. 1-11, 2003.

BLACK, J. W. et al. **Lancet**, London, v. 1, p. 1080, 1964.

BLACK, J. W.; STEPHENSON, J. S. Pharmacology of a new adrenergic beta receptor blocking compound (nethalide). **Lancet**, London, v. 2, p. 311, 1962.

BONNET, N. et al. Severe bone alterations under  $\beta_2$  agonist treatments: bone mass microarchitecture and strength analyses in female rats. **Bone**, New York, US, v. 12, p. 622-633, 2005.

BONNET, N.; PIERROZ, D. D.; FERRARI, S. L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. **J Musculoskeletal Neuronal Interact**, [S.l.], v. 4, p. 94-104, 2008.

BOYLE, W. J.; SIMONET W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, London, v. 423, p. 337-342, 2003.

CAO, H. et al, Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, USA, p. 2755-2766, 2010.

CHAKRAVART, A. et al. Surface RANKL of toll like receptor 4 stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. **Journal of the American Society of Hematologic. Blood**, [S.l.], v. 22, p. 1633-1644, 2009.

CIBIS Investigators and Committees. A randomized trial of b blockade in heart failure: the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). **Circulation**, Baltimore, Md., US, v. 90, p. 1765-73, 1994.

CIMASONI, G. Crevucular fluid updated. **Oral Sci**, Tokyo, JP, v. 12 (III VII), p. 1-152, 1983.

COCOHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal Periodontol**, Chicago, US, p. 1569-1576, 2008.

COMMITTEE of the American Academy of Peridontology. Diagnosis of periodontal diseases. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 74, p. 1237-1247, 2003.

CRABTREE, G. R.; OLSON, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. **Cell**, Cambridge, US, v. 109, p. S67-S79, 2002.

D'AIUTO, F.; READY D; TONETTI, M. S. Periodontal disease and C reactive protein associated cardiovascular risk. **J Periodonol Res**, Compenhagen, v. 39, p. 236-241, 2004.

DESHPANDE, R. G.; KHAN, M. B.; GENCO, C. A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by porphyromonas gingivalis. **Infect Immun**, Washington, US, v. 66, p. 5337-5343, 1998.

ELEFTERIOU, F. et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, London, v. 434, n. 7032, p. 514-520, 2005.

FIRMIDA, C. C.; MESQUITA, E. T. O paradoxo do tratamento da ICC com betabloqueadores: implicação para pacientes hipertensos. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v. 8, p. 458-65, 2001.

FONSECA, Tatiana de Lourdes. Interação do sistema nervoso simpático com o hormônio tireoidiano na regulação da massa e metabolismo ósseos. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009. 43 f. (Tese, Doutorado em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Ciências Biomédicas). Disponível em: <www.teses.usp\teses.br>. Acesso em: 11 nov. 2010.

FONTANELLA, B. J. B. Ansiedade social e abuso de propranolol: relato de caso, **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 4, n. 25, p. 228-330, 2003.

FOURNEAU, E.; BOVET, D. **Arch Int Pharmacodyn Thér**, Belgica, v. 46, p. 178, 1933.

FRANZOSO, G. et al. Requirement for NF kappaB in osteoclast and B cell development. **Genes & Development**, New York, US, v. 11, p. 3482-3496, 1997.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**. São Paulo: Atheneu, 1977. 298 p.

GIACONA, M. B. et al. Porphyromonas gingivalis induces uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro. **FEMS Microbiol Leu**, [S.l.], v. 241, p. 95-101, 2004.

GRAVES, D. T., COCHRAN, D. The contribution of interleukin 1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 74, p. 391-401, 2003.

GREENSTEIN, G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease: a literature review. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 55, p. 684-688, 1984.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 13 p.

HANLEY, D. A. **Biochemical markers aof bone turnover**. In: Hendsen, J. E. Goltzman, D. (Ed.). *The osteoporosis primer*. 1. ed. University Press. Cambridge, 2000, p. 239-252.

HASEGAWA, T. et al. Expression of receptor activator of NF kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. **J Priodontal Res**, Copenhagen, v. 37, p. 405-411, 2002.

HAYES, P.; DAVIS, J. M.; LEWIS, J. A. Meta analysis of value of propranolol in prevention of variceal hemoeehage. **Lancet**, London, v. 336, p. 153-156, 1990.

HERZBERG, M.C.; MEYER, M. W. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. **J Periodontol**, Chicago,US, v. 67, p. 1138-1142, 1998.

HERZBERG, M.C.; MEYER, M. W. Dental plaque and cardiovascular disease. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 3, p. 152-160, 1998.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor kappa b ligand and osteoprotegerin in bone biology. **J Mol Med**, Amsterdam, v. 79, p. 243-253, 2001.

HOGAN, P.G. et al. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes Dev**, New York, US, v. 17, p. 2205-2232, 2003.

HUANG, H. H. et al. Functional alpha1 and beta2 adrenergic receptors in human osteobasts. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia,US, v. 220, p. 267-275, 2009.

IACOPINO, A. M.; CUTLER, C. W. Pathophysiological relationship between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 71, p. 1375-1384, 2000.

IOTSOVA, V. et al. Osteopetrosis in mice lacking NF kappa B1 and kappa B2. **Nature Medicine**, London, v. 3, p. 1285-1289, 1997.

ISHIDA, N. et al. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. **J Biol Chem**, Bethesda, Md., US, v. 277, p. 41147-41156, 2002.

JAY, W. Marks (Ed.) **Propranolol, Inderal, Inderal, L. A. Innopran XL**. Disponível em: <[www.medicinenet.com/propranolol/article.htm](http://www.medicinenet.com/propranolol/article.htm)>. Acesso em: 29 nov. 2010.

KARSENTY, G. Lepting controls bone formation through a hypothalamic relay. **Recent Prog Horm Res**, [S.l.], v. 56, p. 401-415, 2001.

KAWASAKI, K. et al. Effects of aging on RANLJ and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. **Orthod Craniofac Res**, Inglaterra, v. 9, p. 137-142, 2006.

KIM, N. et al. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte expressed TRANCE transgene. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 97, p. 10905-10910, 2000.

KLEEREKOPER, M. et al. The role of three dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. **Calcif Tissue Int**. New York, US, v. 37, p. 594-597, 1985.

KONGO, A. et al. Signal transduction system for interleukin 6 and 11 synthesis by epinephrine in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, US, v. 61, p. 319-326, 2001.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1988. p.335-343.

LEBTEC, D.; PYNARD, T.; BERNEAU, J. A randomized controlled trial of propranolol for the prevention of recurrent gastrointestinal bleeding patients with cirrhosis: final report. **Hepatology**, Orlando, US, v. 4, p. 355-359, 1984.

LENER, U. H. Inflammation induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post menopausal osteoporosis. **J Dent Res**, Washington, US, v. 85, p. 596-607, 2006.

LENER, U. H. Bone remodeling in post menopausal osteoporosis. **J Dent Res** Washington, US, v. 85, p. 584-595, 2006.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontal**, Chicago, US, v. 36, p. 177-187, 1965.

LOPES, F. F. Associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, São Paulo, v. 8, n. 30, p. 379-383, 2008.

MARKS; JAY, W. (Ed.) **Propranolol, Inderal, Inderal LA, Innopran XL**. Disponível em: <<http://www.medicinenet.com/propranolol/article.html>>. Acesso em: 29 nov. 2010.

MINKOWITZ, B. et al. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. **Journal of Orthopedics Research**, [S.l.], v. 9, p. 869-875, 1991.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral & maxilofacial**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998. p. 119-137.

NISHIJIMA, Y. et al. Level of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compressions force on releases from periodontal ligament cells in vitro. **Orthod Craniofac Res**, Oxford, Inglaterra, v. 9, p. 63-70, 2006.

NOACK, B. et al. Relation between periodontal infections and C reactive protein. **J Periodontol**, Chigaco, v. 72, p. 1121-1227, 2001.

OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: Pathogenesis. **Ann Periodontol**, Chigago, v. 1, p. 821.878, 1996.

Okada, Y. et al. Blockade of sympathetic b-receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 502-508, 2010.

PAGER, R. Gingivitis. **J Clin Periodontol**, Compenhagen, v. 13, p. 345-359, 1986.

PAQUETTE, D. W.; BRODALA, N.; NICHOLS, T. C. Cardiovascular disease, inflammation and periodontal infection. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 44, p. 113-126, 2007.

PERRONE, M. G. et al. Stereospecific synthesis and bio activity of novel  $\beta$  adrenoceptor agonist and inverse agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Bari, v. 16, p. 2473-2488, 2007.

PUSSINEN, P. J. et al. Periodontitis decreases the antiatherogenic potency of high density lipoprotein. **J Lipid Res**, Bethesda, Md., US, v. 45, p. 139-147, 2004.

REID, I. R. et al. Effects of a  $\beta$  Blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, USA, p. 5212-5216, 2005.

RICO, H. et al. Calcitonin reduces vertebral fracture rate in postmenopausal crush syndrome. **Bone Miner**, Washington, US, v. 16, p. 131-138, 1992.

RIDKER, P. M. et al. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease. In apparently healthy man. **N Engl J Med**, [S.I.], v. 336, p. 973-979, 1997.

RIDKER, P. M.; GYNN, R. J.; HENNEKENS, C. H. C reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. **Circulation**, Baltimore, Md., US, v. 7, p. 2007-2011, 1998.

ROODMAN, G. D. Advances in bone biology: the osteoclast. **Endocr Rev**, Baltimore, Md., US, v. 17, p. 308-332, 1996.

RUSSO, L. A. T. Osteoporose pós menopausa: opções terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 401-406, 2001.

SAKATA, M. et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. **J Bone Miner Res**, Washington, US, v. 14, p. 1486-1492, 1999.

SALZBERG, T. N. et al. Reactive protein levels in patients with aggressive periodontitis. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 77, p. 933-939, 2006.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI, C. M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab** Rio de Janeiro, v. 46, p. 72-78, 2002.

SERRE, C. M. et al. Evidence for a dense and intimate innervations of the bone tissue, including glutamate containing fibers. **Bone**, New York, v. 25, p. 623-629, 1999.

SLADE, G. D. et al. Acute phase inflammatory response to periodontal disease in the USA population. **J Dent Res**, Washington, US, v. 79, p. 49-57, 2000.

STEVENSON, J. C.; WHITEHEAD, M. I. Postmenopausal osteoporosis. **BMJ**, [S.I.], v. 285, p. 585-288, 1982.

STROSBERG, A. D.; PIETRI ROUXEL, F. **Trends Pharmacol Sci**, London, v. 17, p. 373, 1996.

SISIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, Chicago, US, v. 75, p. 1033-1041, 2004.

TAKAYANAGI, H. et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 3, p. 899-901, 2002.

TAKEDA, S. et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell**, Cambridge, v. 111, p. 305-317, 2002.

TAKEUCHI, T. et al. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3 E1 osteoblast like cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, US, v. 61 p. 579-586, 2001.

TOGARI, A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervations of osteoblastic and osteoclastic cells. **Microsc Res Tech**, New York, v. 58, p. 77-84, 2002.

TOGARI, A. et al. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and  $\beta$  adrenergic receptors in human osteoblast and human osteogenic sarcoma cells. **Neurosci Lett**, [S.I.], v. 233, p. 125-128, 1997.

TOYGAR, H. U. et al. Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long term continuous orthodontic force application. **Angle Orthodontist**, Appleton, Wis., US, v. 78 p. 988-993, 2008.

VAN DER POLL, T. et al. Epinephrine inhibits tumor factor alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. **The Journal of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 97, p. 713-719, 1996.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 415-422, 1999.

VIEIRA, J. G. H. O papel dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo no diagnóstico e seguimento laboratorial das doenças ósteo metabólicas. **Rev Bras Clin Ter**, São Paulo, v. 24, p.73-76, 1998.

VIEIRA, C. L. Z. Relação entre doenças periodontais e aterosclerose subclínica em indivíduos com hipercolesterolemia familiar. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. 37 f. (Tese, Doutorado, Departamento de Cardiologia).

WAAGSTEIN, F. et al. For the Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial study group: beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Lancet**, London, v. 342, p. 1141-1146, 1993.

WOICIECHOWSKY, C. et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin 10 release in immunodepression induced by brain injury. **Nature Medicine**, New York, v. 4, p. 808-813, 1998.

WU, T. et al. Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and HDL cholesterol, C reactive protein, and plasma fibrogen. **Am J Epidemiol**, [S.I.], v. 151, p. 273-282, 2001.

YAMAZAKI, K. et al. Accumulation of human heat shock protein 60 reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 2494-2501, 2002.

YASUDA, H. et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast function. **Bone**, New York, v. 25, p. 109-113, 1999.

YAVROPOULOU, M. P.; YOVOS J. G. Osteoclastogenesis current knowledge and future perspectives. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, [S.l.], v. 8, p. 2004-216, 2008.

YOUNG, J. B. et al. Insuficiências cardíaca e circulatória. **ACCSAP**, [S.l.], v. 4, p. 1, 2000.