



Universidade Ceuma - UNICEUMA

Pró- Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Mestrado em Odontologia

Área de Concentração - Odontologia Integrada

MAYANA SOARES VIEIRA

**EFEITOS DE UM INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE NOREPINEFRINA
SOBRE PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

São Luís

2014

MAYANA SOARES VIEIRA

**EFEITOS DE UM INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE NOREPINEFRINA
SOBRE PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Ceuma, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia Integrada.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciana Salles Branco de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr^º Marcos André dos Santos da Silva

São Luís

2014

MAYANA SOARES VIEIRA

**EFEITOS DE UM INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE NOREPINEFRINA
SOBRE PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

Esta dissertação foi apresentada para a obtenção do título de “Mestre em Odontologia”,
área de concentração Odontologia Integrada, pela Universidade Ceuma, em 10 de
março de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Luciana Salles Branco de Almeida
Orientadora

Prof^ª Dr^ª Liana Linhares Lima
Membro

Prof^ª Dr^ª Elizabeth Soares Fernandes
Membro

Dedico esta Tese

A meus pais, **Gilvan e Marcly**, e meu irmão, **Guilherme**,
pelo incentivo e apoio constante,
por todo o amor e dedicação. Amo vocês...

Agradecimento Especial

À minha orientadora, **Prof^a Dr^a Luciana Salles Branco de Almeida**, pelo apoio incansável para a realização deste trabalho. Pelo apoio incondicional em todas as atividades realizadas durante meu mestrado, por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar a crescer cada vez mais. Você é o exemplo de professora, orientadora, mãe, amiga. Obrigada pelas oportunidades!

Agradecimentos

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia**, pela contribuição ao meu crescimento profissional.

À **Profª Drª Ana Lia Anbinder**, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo apoio e todos os ensinamentos durante a realização do meu estágio.

Às alunas do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, **Gabriela Lima e Renata Moraes**, pela companhia, amizade e apoio durante o estágio.

Aos **Professores Gilson Cesar Nobre Franco e Pedro Luiz Rosalen**, pela ajuda e contribuição para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos de mestrado, **Amanda Calixto, Rufino Klug, Fabrício Lima e Murilo Neves**, pela companhia, amizade durante esses anos.

Ao amigo **Rodrigo Cutrim**, pela amizade, preocupação, conselhos e por sempre estar presente em todos os momentos.

VIEIRA, Mayana Soares. **EFEITOS DE UM INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE NOREPINEFRINA SOBRE PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia Integrada). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Ceuma.

Resumo

A desipramina, um inibidor da recaptação de norepinefrina, possui propriedades anti-inflamatórias e imuno-moduladoras. O presente estudo investigou os efeitos da desipramina sobre a resposta inflamatória e o dano tecidual em modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Foram utilizados ratos Wistar machos, distribuídos, aleatoriamente, em três grupos (n=10 animais/ grupo): 1) grupo controle – ratos sem ligadura e submetidos a gavagem com solução salina (NaCl 0,9%); 2) grupo ligadura – ratos com ligadura e submetidos a gavagem com solução salina; 3) grupo desipramina – ratos com ligadura e submetidos a gavagem com desipramina (20 mg/ kg/ dia) em solução salina. As análises histológicas foram realizadas em região de furca dos primeiros molares, para avaliação de perda óssea alveolar, ou em tecido gengival da mesial dos primeiros molares para avaliação das fibras colágenas, 15 dias após indução de doença periodontal. Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) foi realizada para analisar a expressão de RNAm para interleucina (IL)-1 β , ciclo-oxigenase (COX)-2, óxido nítrico sintase induzida (NOSi), metaloproteinase de matriz (MMP)-9 e inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP)-1 em amostras de tecidos gengivais coletadas após 3 dias de indução da doença periodontal. Os resultados mostraram que a expressão de todos os genes avaliados e a perda óssea foram maiores no grupo ligadura em comparação ao grupo controle (P < 0,05). A perda óssea alveolar foi reduzida no grupo desipramina em comparação com o grupo ligadura (P < 0,05). Além disso, a administração de desipramina reduziu as

expressões de IL-1 β , NOSi e TIMP-1 em comparação ao grupo ligadura ($P < 0,05$). A desipramina não foi capaz de alterar, significativamente, as expressões de COX-2 e MMP-9, bem como a degradação de fibras colágenas, no tecido gengival, em comparação ao grupo ligadura ($P > 0,05$). Concluiu-se que a desipramina é capaz de reduzir a expressão de mediadores inflamatórios e a reabsorção óssea em doença periodontal induzida em ratos, sugerindo que possa ser investigada como um possível fármaco modulador da resposta do hospedeiro em doença periodontal.

Palavras-chave: Desipramina, inflamação, periodontite, reabsorção óssea, interleucina-1beta, óxido nítrico sintase, colágeno.

VIEIRA, Mayana Soares. **EFFECTS OF A NOREPINEPHRINE REUPTAKE INHIBITOR IN A RAT MODEL OF LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS.** 2014. Dissertation (Master in Dentistry - Integrate Dentistry). Graduate Program in Dentistry - CEUMA University.

Abstract

Desipramine, a selective norepinephrine reuptake inhibitor, has possesses anti-inflammatory and immune-regulatory properties. The present study investigated the effects of desipramine on tissue damage in a rat model of ligature-induced periodontitis (PD). Male Wistar rats were randomly assigned into three groups (n=10 animals/group): 1) Control group- rats without ligature and subjected to oral gavage with saline (0.9% NaCl); 2) Ligature group- rats with ligature subjected to oral gavage with saline; 3) Desipramine group- rats with ligature subjected to oral gavage with desipramine (20 mg/kg/day in saline). Histological analyses were performed on the furcation region of mandibular first molars, for evaluation of alveolar bone loss, or in gingival tissue in the mesial of the first molars for evaluation collagen fibers, 15 days after induction of periodontal disease. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to analyze the mRNA expression of interleukin (IL)-1 β , cyclooxygenase-2 (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP 1) in gingival tissue sampled collected after 3 days of induction periodontal disease. The results showed that the expression of all genes evaluated and bone loss were higher in the ligature group compared to the control group ($P < 0.05$). Alveolar bone loss was reduced in desipramine group compared with the ligature group ($P < 0.05$). Furthermore, administration desipramine reduced the expression of IL- 1 β , TIMP-1 and iNOS compared to the ligature group (P

< 0.05). Desipramine was not able to alter the expression of COX-2 and MMP- 9 as well as the degradation of collagen fibers in the gingival tissue as compared to ligature group (P> 0.05). It was found that desipramine is able to reduce the expression of inflammatory mediators and bone resorption in periodontal disease induced in rats, suggesting that desipramine should be investigated as a promising therapeutic approach for periodontal diseases.

Keywords: Desipramine, inflammation, periodontitis, bone resorption, interleukin-1beta, inducible nitric oxide synthase, collagen.

Lista de Abreviaturas e Siglas

IL-1 β : interleucina 1 beta

COX: cicloxigenase

COX-1: Cicloxigenase 1

COX-2: Cicloxigenase 2

NOSi: óxido nítrico sintase induzida

MMP: metaloproteinase da matriz

TIMP: inibidor de metaloproteinase

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

mg: miligrama

kg: kilograma

NaCl: cloreto de sódio

μ m: micrômetro

TNF- α : fator de necrose tumoral

PGE₂: prostaglandina E2

RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa beta

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta

NF- κ β : fator nuclear kappa beta

PMNs: polimorfonucleares

NO: óxido nítrico

SUMÁRIO

1 Introdução.....	12
2 Artigo.....	18
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Métodos.....	23
Animais.....	23
Indução de doença periodontal, divisão dos grupos e tratamentos.....	24
Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos.....	25
Análises histológicas.....	25
Avaliação da reabsorção óssea alveolar.....	25
Avaliação de colágeno no tecido conjuntivo.....	26
Isolamento de RNA.....	26
Detecção de IL-1 β , COX-2, NOSi, MMP-9 e TIMP-1 por RT – PCR.....	27
Análises estatísticas.....	28
Resultados.....	28
Discussão.....	29
Agradecimentos.....	35
Referências.....	35
Legenda das figuras.....	42
Figuras.....	43
3. Conclusão.....	47
4. Referências.....	47
5. Anexos.....	53
Comitê de ética.....	54
Normas da revista.....	55

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal pode ser definida como uma infecção crônica de caráter inflamatório que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com perda progressiva de inserção, reabsorção óssea e migração apical do epitélio juncional (Van Dyke & Serhan, 2003). Essa inflamação é provocada por uma resposta inata ou adaptativa a vários micro-organismos associados ao biofilme dental (Zadeh *et al.*, 2000; Taubman *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2002). Estudos tem demonstrado que a etiologia da doença periodontal deriva de bactérias patogênicas como, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, os quais são altamente prevalentes em indivíduos periodontalmente comprometidos (Socransky *et al.*, 1998; 1999; Cortelli *et al.*, 2008).

O desafio microbiano, representado pelos micro-organismos gram-negativos anaeróbios presentes no biofilme, leva a uma regulamentação alta da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro nos tecidos periodontais, que é caracterizada pela produção desregulada e aumentada de citocinas pró-inflamatórias, prostanóides e enzimas (Salvi & Lang, 2005). Esses mediadores pró-inflamatórios estimulam os osteoblastos e outras células residentes nos tecidos periodontais, especialmente fibroblastos e linfócitos T ativados, a expressarem o RANKL (Taubman *et al.*, 2005; Wada *et al.*, 2006). O RANKL, ao se ligar ao seu receptor RANK, induz ao processo de diferenciação/ativação de osteoclastos, levando, assim, a um desequilíbrio do metabolismo ósseo e à conseqüente reabsorção óssea (Kong *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 2006).

Dentre as várias citocinas pró-inflamatórias relacionadas à doença periodontal,

destacam-se o TNF- α e a IL-1 β , pois estas citocinas estimulam a reabsorção por induzir a proliferação de progenitores de osteoclastos, por estimular de forma indireta a atividade de reabsorção dos osteoclastos maduros (Assuma *et al.*, 1998) e por estimular a síntese de PGE₂ e collagenases, como as MMPs (Mcgee *et al.*, 1988). Segundo Lima *et al.* (2008), o bloqueio de TNF- α ou de IL-1 β contribui para a inibição de 80% do recrutamento de células inflamatórias e redução de 60% da perda óssea na doença periodontal.

As prostaglandinas exercem várias funções nas reações inflamatórias e contribuem, principalmente, com os fenômenos de permeabilidade vascular e vasodilatação na microcirculação (Chabdrasekharan *et al.*, 2002). A formação das prostaglandinas, as quais estão sob o controle das isoenzimas COX-1 e COX-2, ocorre em maiores quantidades nos sítios inflamados (Chabdrasekharan *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2008). As principais alterações inflamatórias observadas na doença periodontal, incluindo eritema gengival, edema e reabsorção óssea podem ser, pelo menos em parte, mediadas por ações diretas das prostaglandinas, principalmente aquelas da série E (PGE₂), produzidas pela COX-2 (Offenbacher *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2005). Sobre esse assunto, diversos estudos sugerem que a concentração de PGE₂ ou a expressão de COX-2 no tecido gengival podem ser utilizadas como marcadores da periodontite (Offenbacher *et al.*, 1986; Heasman *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2005) .

As MMPs constituem vias importantes no dano tecidual associada com a doença periodontal, devido ao seu papel na degradação patológica da matriz extracelular nos tecidos periodontais (Hannas *et al.*, 2007). Juntamente com os TIMPs, as MMPs também possuem um papel-chave na remodelação do tecido fisiológico de tecidos periodontais, e um desequilíbrio entre as MMPs e TIMPs tem sido observada em associação com ruptura do tecido e a doença periodontal (Garlet *et al.*, 2004). Em

particular, a gelatinase MMP-9 tem sido identificada em sítios periodontais ativos de humanos e ratos, estando relacionada com a regulação da resposta inflamatória e da migração celular presentes no processo de reparo tecidual e com a gravidade da doença (Kubota *et al.*, 1996; Mohan *et al.*, 2002; Ejeil *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2005). Segundo Nguyen *et al.* (2001), a MMP-9 é secretada de maneira não constitutiva e por um número limitado de células, o que a torna um importante mediador inflamatório na doença periodontal.

O papel dos TIMPs em inibir a atividade das MMPs nos processos de morfogênese ou de remodelação da matriz está bem documentado, e sabe-se que TIMP-1 inibe a atividade de muitas MMPs, com exceção da MMP-2 (Yoshida *et al.*, 2003). Em acréscimo, outras atividades não-dependentes de MMPs tem sido descritas para o TIMP-1. Por exemplo, durante a mineralização do dente, a MMP-9, que é secretada pelos ameloblastos, é inibida por TIMP-1 (Ogata *et al.*, 1995); Yan *et al.*, (1992), mostraram que o TIMP-1 possui função de promover o crescimento celular enquanto que Liu *et al.*, (2003) demonstraram que o TIMP-1 possui efeitos anti-apotóticos. A ação de TIMP-1 sobre a diferenciação de eritrócitos e linfócitos B também já foi demonstrada (Petifre *et al.*, 2000) bem como a contribuição de TIMP-1 na diferenciação de odontoblastos (Yoshida *et al.*, 2003). Quanto à doença periodontal Oyarzún *et al.* (2010) e Letra *et al.* (2012) demonstraram que o TIMP-1 está aumentada em periodontite crônica e reduzida em tecido gengival saudável.

Outro fator que pode contribuir para a destruição tecidual presente na doença periodontal é o óxido nítrico (NO) (Lappin *et al.*, 2000; Rodini *et al.*, 2008). Há controvérsias em relação a função e atividades biológicas desse mediador, pois, por um lado, o NO é considerado um radical altamente reativo, participando de mecanismos de defesa e permitindo o crescimento exagerado de bactérias (Bjornsson *et al.*, 2004); e,

por outro lado, o NO apresenta citotoxicidade contra várias células além de atuar como um mediador inflamatório (Hamid *et al.*, 1993). Vários autores demonstraram a presença da enzima NOSi, a qual está relacionada à produção de NO, em doença periodontal inflamatória, e ela tem sido considerada um marcador de doença periodontal ativa (Kendal *et al.*, 2000; Lappin *et al.*, 2000; Di Paola *et al.*, 2004).

Todos os mediadores inflamatórios citados (TNF- α , IL-1 β , PGE₂, MMP-9, TIMP-1 e NOSi) costumam estar presentes em níveis elevados no sulco gengival de sítios doentes e são responsáveis pela perpetuação da destruição do tecido ósseo que caracteriza a periodontite crônica (Offenbacher *et al.*, 1986; Heasman *et al.*, 1993; Assuma *et al.*, 1998; Chabdrasekharan *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Hannas *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008; Garlet *et al.*, 2008; Oyarzún *et al.*, 2010; Letra *et al.*, 2012).

O controle do biofilme dental por meio de sua remoção mecânica com raspagem e alisamento radicular (terapia convencional), em associação a um programa regular de reavaliação clínica e manutenção da higiene oral pelos pacientes, são considerados a principal forma de manejo da doença periodontal (Tonetti *et al.*, 2000; Axelsson *et al.*, 2004). No entanto, além da terapia convencional, pode-se adotar também o uso coadjuvante de fármacos, os quais podem agir combatendo o desafio microbiano ou modulando a resposta imune do hospedeiro (Ciancio, 2002; Novak & Donley, 2002; Reddy *et al.*, 2003).

O emprego de agentes farmacológicos capazes de modular a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro vem sendo considerado uma importante e promissora terapia coadjuvante aos procedimentos mecânicos convencionais, especialmente nos casos onde a raspagem e o alisamento radicular, por si só, não forneçam melhoras na inflamação e nos níveis de inserção (Novak & Donley, 2002; Reddy *et al.*, 2003). O

único fármaco aprovado como modulador da resposta do hospedeiro para a doença periodontal pela *Food and Drug Administration* é a doxiciclina em doses subantimicrobianas (Garlet *et al.*, 2004; Caton & Ryan, 2011). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a doxiciclina inibe a atividade de colagenases por um mecanismo independente de sua eficácia antimicrobiana e pode reduzir a perda óssea alveolar, reduzir o número de osteoclastos e preservar o cemento (Bezerra *et al.*, 2000; Sorsa & Golub, 2005). Clinicamente, administrações de 20mg de doxiciclina, durante 6 meses, estão relacionadas com a redução da gravidade de danos aos tecidos periodontais (Crout *et al.*, 1996; Caton & Ryan *et al.*, 2011).

Após vários estudos demonstrando que baixas doses de doxiciclina são capazes de reduzir a perda óssea inflamatória (Grevstad & Boe, 1995; Crout *et al.*, 1996; Chang & Yamad, 2000; Llavaneras *et al.*, 2001; Bezerra *et al.*, 2002), estudos mais recentes tem investigado o efeito de “novos” fármacos sobre as principais vias de modulação da resposta do hospedeiro, sendo observadas ações inibitórias de algumas drogas sobre citocinas pró-inflamatórias, enzimas ciclo-oxigenases e/ou prostanoídes, NOSi, MMPs e osteoclastogênese (sistema RANK-RANKL) (Kirkwood *et al.*, 2007).

Fármacos antidepressivos vem apresentando ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras em estudos *in vitro* e *in vivo* em acréscimo à sua ação sobre a depressão e/ou desordens neurológicas associadas (Abdel-Salam *et al.*, 2003; Roumestan *et al.*, 2007; Diamond *et al.*, 2006; Branco-de-Almeida *et al.*, 2011, 2012). Nesse contexto, a desipramina tem-se mostrado capaz de modular a expressão de mediadores inflamatórios e as respostas imunes celulares, em modelos de inflamação periférica (Guemei *et al.*, 2008; Branco-de-Almeida *et al.*, 2011). A desipramina é um fármaco da classe dos antidepressivos tricíclicos inibidores não-seletivos de recaptura de monoaminas. Sabe-se que a desipramina incrementa a concentração sináptica de

norepinefrina e serotonina no SNC, inibindo a absorção desse neurotransmissor pela membrana pré-sináptica (Kohm & Sanders, 2001). A desipramina constitui o principal metabólito ativo da imipramina, com ações e usos clínicos similares à amitriptilina, porém possuindo menor efeito sedativo. Além de ser utilizada no tratamento de várias formas de depressão, normalmente em conjunto com a psicoterapia, a desipramina é também utilizada como analgésico coadjuvante da dor crônica (Dharmshaktu *et al.*, 2012). Além das ações antidepressivas e de controle de dor crônica, estudos envolvendo a desipramina vêm demonstrando propriedades anti-inflamatórias/ imunomoduladoras em diversos modelos de inflamação *in vivo*, incluindo modelo de colite ulcerativa (Guemei *et al.*, 2008) e sepse (Roumestan *et al.*, 2007).

O estudo de Guemei *et al.* (2008) demonstrou que o tratamento de ratos com desipramina em doses de 10 ou 20 mg/kg ao dia, administrada durante 2 semanas após a indução da colite ulcerativa, reduziu a inflamação do cólon e o dano agudo induzido pelo ácido acético como verificado por análises macroscópicas e bioquímicas. Os achados desse estudo mostraram que a desipramina possui efeitos anti-inflamatórios, pois reduziu, significativamente, os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β .

No estudo de Roumestan *et al.* (2007), a desipramina afetou a capacidade dos monócitos e células epiteliais do pulmão de produzir citocinas inflamatórias *in vitro* em um modelo animal de choque séptico e asma alérgica.

O estudo de Abdel-Salam (2003) observou que a imipramina, que possui a desipramina como seu principal metabólito ativo, assim como outros antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, clomipramina), apresentaram atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação em edema de pata.

Os estudos avaliando o efeito da desipramina sobre MMPs e TIMPs são escassos. Benekarredy *et al.* (2008), em um estudo avaliando o hipocampo de ratos, mostrou que

fármacos antidepressivos, como a desipramina, podem alterar a expressão dos TIMPs sem qualquer efeito sobre a expressão ou atividade de MMP- 2 e 9. Nesse estudo, a desipramina reduziu a expressão de TIMP-4 sem apresentar influência sobre MMPs 2 e 9.

Alguns estudos *in vitro* também demonstraram a capacidade anti-inflamatória e imuno-moduladora da desipramina. O estudo de O'Sullivan *et al.* (2008) demonstrou que o tratamento agudo de ratos com inibidores de recaptção de norepinefrina, a desipramina e a atomoxetina, apresentou ações anti-inflamatórias, como a redução na expressão de IL-1 β , TNF- α e NOSi em córtex de ratos após um desafio sistêmico com LPS. Um estudo recente sugeriu uma possível influência da desipramina sobre a inflamação periodontal *in vivo*, pois a desipramina diminuiu a capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas e a proliferação de linfócitos T (Branco-de-Almeida *et al.*, 2011). Os linfócitos T são considerados as células-chave para ativação do processo de reabsorção óssea em doença periodontal, em especial devido à sua capacidade de produção de RANKL (Taubman *et al.*, 2005; 2007).

Considerando as ações anti-inflamatórias e de imuno-modulação da desipramina descritas na literatura, é possível que este fármaco possua efeitos sobre o processo inflamatório no contexto da doença periodontal. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da desipramina sobre importantes vias de modulação da resposta do hospedeiro em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos. Para tanto, verificou-se os efeitos da desipramina sobre a reabsorção óssea e integridade do colágeno, investigando-se uma possível relação desses efeitos com a expressão de genes relacionados a tais alterações teciduais, incluindo IL-1 β , COX-2, NOSi, MMP-9 e TIMP-1.

1. ARTIGO

1.1 Versão em português

Efeitos de um inibidor da recaptção de norepinefrina sobre periodontite induzida em ratos

Mayana S. Vieira^{*}, Marcos A. S. da Silva^{*}, Ana Lia Anbinder[§], Gilson C. N. Franco[‡], Pedro L. Rosalen[¶], Luciana S. Branco-de-Almeida^{†,*}

^{*} Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brasil,
Universidade Ceuma, MA, Brasil

[†] Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
MA, Brasil

[‡] Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Campinas,
Piracicaba, SP, Brasil.

[§] Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil

[¶] Departamento de Biologia Oral, Universidade de Taubaté, SP, Brasil

Palavras-chave: Desipramina, inflamação, periodontite, reabsorção óssea, IL-1 β , óxido nítrico sintase, colágeno.

Artigo formatado segundo as normas do *Journal of Periodontology*

Autora para correspondência:

Luciana Salles Branco-de-Almeida

Av. dos Portugueses, 1.966, Bacanga

CEP: 65085-580

São Luís, MA, Brazil

Fone: +55 98 32728575

e-mail: lusbalmeida@yahoo.com.br

Resumo

A desipramina, um inibidor da recaptação de norepinefrina, possui propriedades anti-inflamatórias e imuno-moduladoras. O presente estudo investigou os efeitos da desipramina sobre a resposta inflamatória e o dano tecidual em modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

Métodos: Ratos Wistar machos foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos (n=10 animais/ grupo): 1) grupo controle – ratos sem ligadura e submetidos a gavagem com solução salina (NaCl 0,9%); 2) grupo ligadura – ratos com ligadura e submetidos a gavagem com solução salina; 3) grupo desipramina – ratos com ligadura e submetidos a gavagem com desipramina (20 mg/ kg/ dia) em solução salina. Análises histológicas foram realizadas em região de furca dos primeiros molares, para avaliação de perda óssea alveolar, ou em tecido gengival da mesial dos primeiros molares para avaliação das fibras colágenas, 15 dias após indução de doença periodontal. Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) foi realizada para analisar a expressão de RNAm para interleucina (IL)-1 β , ciclo-oxigenase (COX)-2, óxido nítrico sintase induzida (NOSi), metaloproteinase de matriz (MMP)-9 e inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP)-1 em amostras de tecidos gengivais coletadas após 3 dias de indução da doença periodontal.

Resultados: A expressão de todos os genes avaliados e a perda óssea foram maiores no grupo ligadura em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). A perda óssea alveolar foi reduzida no grupo desipramina em comparação com o grupo ligadura ($P < 0,05$). Além disso, a administração de desipramina reduziu as expressões de IL-1 β , NOSi e TIMP-1 em comparação ao grupo ligadura ($P < 0,05$). A desipramina não foi capaz de alterar,

significativamente, as expressões de COX-2 e MMP-9, bem como a degradação de fibras colágenas, no tecido gengival, em comparação ao grupo ligadura ($P > 0,05$).

Conclusão: A desipramina reduziu a expressão de mediadores inflamatórios e a reabsorção óssea em doença periodontal induzida em ratos, sugerindo que possa ser investigada como um possível fármaco modulador da resposta do hospedeiro em doença periodontal.

Palavras-chave: Desipramina, inflamação, periodontite, reabsorção óssea, IL-1 β , colágeno.

Introdução

A doença periodontal pode ser definida como uma infecção crônica de caráter inflamatório que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com degradação de colágeno, reabsorção óssea e perda progressiva de inserção⁴¹. Atualmente, a doença representa a principal causa de perda do elemento dental, além de agir como um fator modificador para a saúde sistêmica³⁶.

Bactérias específicas (periodontopatógenos) presentes no biofilme dental, considerado o fator etiológico essencial para o início da doença, promovem a exposição dos tecidos periodontais aos seus produtos e componentes estruturais (como lipopolissacarídeos, fímbrias e enzimas) e, conseqüentemente, ativam a resposta imuno-inflamatória local dos tecidos frente a estas toxinas, induzindo a destruição tecidual observada com a progressão da doença^{7,26}.

A complexa resposta imuno-inflamatória do hospedeiro é responsável por maior parte da degradação tecidual e envolve, dentre outros aspectos, uma estreita relação entre citocinas pró-inflamatórias (especialmente IL-1 β , TNF- α , PGE₂), derivados do óxido nítrico, MMPs, TIMPs e metabolismo ósseo^{23,39}. As citocinas pró-inflamatórias

IL-1 β e TNF- α são consideradas moléculas-chave na reabsorção óssea periodontal, pois estimulam a secreção de RANKL por osteoblastos e células do estroma, gerando sua ligação ao receptor RANK e a consequente ativação de células precursoras de osteoclastos^{39,21}.

O controle do biofilme dental, por meio de sua remoção mecânica (terapia convencional), constitui a principal forma de manejo da doença periodontal^{40,4}. Sabe-se, entretanto, que alguns pacientes não respondem positivamente à redução do desafio microbiano e poderiam ser beneficiados por meio de terapia farmacológica adjunta com fármacos que atuam sobre os mediadores inflamatórios específicos do hospedeiro gerados durante o processo inflamatório e as respostas imunes celulares²⁹. Como terapia de modulação da resposta do hospedeiro, os estudos tem focado na inibição de uma ou mais das seguintes vias da resposta do hospedeiro: citocinas pró-inflamatórias, enzimas ciclo-oxigenases e/ou prostanóides, óxido nítrico ou NOSi, MMPs e osteoclastogênese (via RANK-RANKL)²².

Fármacos antidepressivos vem apresentando ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras em estudos *in vitro* e *in vivo* em acréscimo à sua ação sobre a depressão e distúrbios neurológicos associadas^{1,13,34,18,30,8,9}. Nesse contexto, a desipramina, um antidepressivo tricíclico inibidor seletivo da recaptção de norepinefrina, tem-se mostrado capaz de modular a expressão de mediadores inflamatórios e as respostas imunes celulares, em modelos de inflamação periférica^{18,9}.

Embora hajam resultados promissores quanto à sua capacidade imuno-reguladora, os efeitos da desipramina na doença periodontal ainda são desconhecidos. Um estudo recente *in vitro* sugeriu uma possível influência da desipramina sobre a inflamação periodontal uma vez que ela diminui a capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas e a proliferação de linfócitos T⁸. Os linfócitos T são considerados as

células-chave para a ativação do processo de reabsorção óssea na doença periodontal, em especial devido à sua capacidade de produção de RANKL^{38,39}.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da desipramina sobre importantes vias de modulação da resposta do hospedeiro em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos. Para tanto, verificou-se os efeitos da desipramina sobre a reabsorção óssea e integridade do colágeno, investigando-se uma possível relação com a expressão de genes relacionados a tais alterações teciduais, incluindo IL-1 β , COX-2, NOSi, MMP-9 e TIMP 1.

Material e Métodos

Animais

Esse estudo *in vivo* teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 1499-1, Anexo 1). Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, SPF – *Specific Pathogen Free*) obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas, SP, Brasil), com idade de aproximadamente 8 semanas e peso entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico e receberam ração balanceada e água *ad libitum* durante todo o período em que estiverem acondicionados no biotério. A temperatura da sala foi mantida a 21 ± 2 °C e sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas. O comportamento e a aparência física dos animais foram monitorados diariamente e o seu peso foi determinado durante o período experimental. A manipulação dos animais seguiu as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Indução de doença periodontal, divisão dos grupos e tratamentos

Os animais submetidos à indução de doença periodontal foram anestesiados, previamente, utilizando as soluções de cloridrato de ketamina (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (25 mg/Kg) por via intramuscular. Para indução da doença periodontal, foi utilizado fio de algodão para confecção de ligaduras, passando pelo espaço interproximal, em torno dos primeiros molares inferiores direitos, em nível de sulco gengival²⁰. Dois nós foram feitos na mesial dos primeiros molares, a fim de imobilizar a ligadura. Animais sem ligadura foram utilizados como grupo controle.

Após colocação da ligadura nos animais que foram submetidos à indução da doença periodontal, os animais foram, aleatoriamente, divididos em três grupos para cada período experimental: grupo 1 (n = 10 animais) - ratos sem ligadura que receberam gavagem diária com solução de NaCl 0,9% (grupo controle); grupo 2 (n = 10 animais) - ratos com ligadura que receberam gavagem diária com solução de NaCl 0,9% (grupo ligadura); grupo 3 (n = 10 animais) - ratos com ligadura que receberam gavagem diária de 20 mg/kg de cloridrato de desipramina (grupo desipramina). Imediatamente antes da administração aos animais, o cloridrato de desipramina (Sigma[®]) foi dissolvido em solução salina (veículo). Os tratamentos (NaCl 0,9% ou desipramina) foram administrados 1 hora antes da fixação de ligadura e diariamente durante os períodos experimentais de 3 ou 15 dias^{33,9}.

Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos

Após sacrifício dos animais sob anestesia profunda, o tecido gengival em torno da ligadura de animais tratados durante 3 dias foi coletado, imediatamente congelados e mantidos a -80 °C até o processamento para análise das expressões de IL-1 β COX-2, iNOS, MMP-9 e TIMP-1. Os animais sacrificados após 15 dias de indução da doença periodontal tiveram suas hemiarcadas inferiores removidas e processadas para as avaliações histológicas de reabsorção óssea na área de furca (peças coradas com hematoxilina & eosina – H&E) e de integridade do colágeno (peças coradas com vermelho de picro-sírius).

Análises Histológicas

Para os processamentos histológicos, as hemiarcadas alveolares foram imediatamente fixadas em formalina 10% tamponada neutra e, em seguida, descalcificadas com solução aquosa de EDTA 10%, durante 60 dias. Os espécimes descalcificados foram desidratados e embebidos em parafina. Cortes seriados obtidos em uma direção mesiodistal (5 μ m de espessura) foram corados com H&E para a medição da reabsorção óssea ou com vermelho de picro-sírius para a avaliação do teor de colágeno⁹.

Avaliação da perda óssea periodontal

As imagens de cinco secções semi-seriadas coradas com H&E foram digitalizadas com uma magnitude de 50x. A influência da desipramina sobre a perda óssea periodontal foi histometricamente avaliada através da medição da área (mm²) de reabsorção óssea na região de furca. A avaliação foi realizada por um único

examinador, cego para a atribuição de tratamentos, usando um sistema de análise de imagem (*ImageJPro® Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA*). Espécimes do osso alveolar do grupo controle (sem ligadura) também foram medidas para comparar os resultados de ambos os grupos de ligadura.

Avaliação de colágeno no tecido conjuntivo

Para avaliar os efeitos da desipramina sobre a alteração inflamatória de fibras colágenas no tecido conjuntivo, três secções equidistantes foram obtidas a partir da região correspondente à mesial dos primeiros molares e, em seguida, coradas com vermelho de picro-sírius³². As imagens das secções foram obtidas por microscopia de polarização e de digitalização com uma magnitude de 400x. Inicialmente, as imagens de fibras colágenas que apresentaram tonalidade vermelha foram selecionadas através de um software de processamento de imagem (*Adobe Photoshop, version 7.0.1, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA*). As imagens selecionadas foram, então, transferidas para outro software de imagem, onde foram binarizadas, e a percentagem de área preenchida por fibras de colágeno foi calculada e comparada com os valores obtidos do grupo controle.

Isolamento de RNA

O RNA total foi isolado a partir de tecidos gengivais utilizando-se um reagente específico (*TRIzol® reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi ressuspensão em solução de água ultrapura isenta de DNase/ RNase e armazenado a -80 °C. A concentração de RNA e sua qualidade foram

determinadas utilizando um espectrofotômetro a 280/260 nm (*Nanodrop Spectrophotometer, modelo ND-3300, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*). DNase (*DNase I, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) foi usado para eliminar a contaminação de DNA genômico.

Detecção de IL - 1 β , COX - 2, NOSi, MMP -9 e TIMP-1 por meio de RT – PCR

O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir de RNA total (500 mg), utilizando-se transcriptase reversa e iniciadores aleatórios (*SuperScript Synthesis System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Subsequentemente, o DNAc resultante foi amplificado por PCR com Taq DNA polimerase (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). As sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação de genes de RNAm alvo foram: IL - 1 β , sense 5' - TCCATGAGCTTTGTACAAGG - 3', anti-sense 5' - GGTGCTGATGTACCAGTTGG - 3', 237bp, a COX - 2, sense 5' - TGATGACTGCCCAACTCCCATG - 3', anti-sense 5' - AATGTTGAAGGTGTCCGGCAGC - 3', 702 pb; MMP - 9, sense 5' - GGATTACCTGTACCGCTATGGTTA - 3', anti-sense 5' - TTGGATCCAATAGGTGATGTTATG - 3', 241bp; iNOS, sense 5' - ACAACAGGAACCTACCAGCTCA - 3', anti-sense 5' - GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA - 3', 651 pb. A amplificação da desidrogenase do gliceraldeído - 3 - fosfato (GAPDH) gene (sense 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3', anti-sense 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3', de 450 bp) foi utilizado como um controle interno. As condições da PCR foram 30-35 ciclos a 94 °C durante 30s; 55-60 °C durante 30s e 72 °C durante 1 min. O tamanho dos produtos de PCR foi determinada por comparação com a escala de 100 bp (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*).

Os géis de agarose contendo os produtos amplificados foram digitalizados e analisados pelo programa ImageJ (*ImageJ® Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA*), que forneceu os valores numéricos que permitiram uma comparação entre as semi-quantitativa de genes-alvo e o gene de controle interno.

Análises estatísticas

Os dados dos ensaios foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os resultados foram submetidos à análise de 1 via de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas entre os três grupos foram analisados por meio de teste de Bonferroni com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico *Graph Pad Prism 5.0*.

Resultados

A Figura 1 apresenta cortes histológicos representativos corados com H&E ilustrando a área de furca de animais dos três grupos avaliados (A, B e C), bem como os efeitos da desipramina sobre a reabsorção óssea (D). O grupo experimental tratado com desipramina apresentou níveis mais baixos de perda óssea em comparação com o grupo ligadura ($P < 0,05$, Figura 1D).

Os efeitos da desipramina sobre a integridade do colágeno no tecido gengival encontram-se na Figura 2. As Figuras 2A, 2B e 2C referem-se a cortes histológicos representativos do tecido conjuntivo gengival de animais dos grupos controle, ligadura e desipramina. O grupo desipramina apresentou perfil semelhante ao grupo ligadura, e ambos foram estatisticamente diferentes do grupo controle ($P < 0,05$, Figura 2D).

Portanto, a desipramina não influenciou positivamente o colágeno no presente estudo (Figura 1B).

As análises de RT-PCR, que verificaram a influência do fármaco sobre a expressão gênica de importantes vias de modulação da resposta do hospedeiro, demonstrou que as expressões de IL - 1 β , NOSi e TIMP-1 foram diminuídas no grupo tratado com desipramina em comparação ao grupo ligadura ($P < 0,05$), sem alterar, significativamente, a expressão de COX-2 e MMP-9 (Figura 3 – A-F).

Discussão

O presente estudo demonstrou que o tratamento oral com desipramina foi capaz de modular a expressão de importantes mediadores inflamatórios periodontais (IL-1 β , NOSi e TIMP-1) e a reabsorção óssea em ratos submetidos a um modelo experimental de doença periodontal induzida por ligadura^{33,3}. Os resultados obtidos confirmam as ações anti-inflamatórias descritas, anteriormente, para a desipramina e sugerem um potencial do fármaco para utilização como modulador da resposta do hospedeiro em doença periodontal.

Neste estudo, utilizou-se um modelo experimental de indução da doença periodontal que consistiu na colocação de uma ligadura ao redor da região cervical do primeiro molar inferior. A ligadura tem a função de agir tanto como um fator promotor da formação de biofilme dental quanto como um trauma mecânico, permitindo uma interação hospedeiro-biofilme^{2,16,37}. O início da doença periodontal por micro-organismos e a destruição tecidual relacionada ao efeito direto bacteriano ou à ativação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro tem sido observados utilizando-se este modelo em diferentes períodos experimentais^{27,20,33,3,9}.

Dentre as vias de modulação investigadas, a redução das expressões de IL-1 β e NOSi parece ter sido responsável pela influência positiva sobre a reabsorção óssea observada no presente estudo. Estudos anteriores com modelos de inflamação também demonstraram a redução da citocina pró-inflamatória IL-1 β após tratamento com desipramina^{18,30}. A IL-1 β constitui uma citocina de caráter multifuncional envolvida nas respostas imunes e inflamatórias em doença periodontal¹⁸. Esta citocina direciona e estimula uma cascata de eventos destrutivos nos tecidos periodontais, incluindo a produção de PGE₂ e de MMPs³⁵. A IL-1 β tem sido considerada uma importante mediadora na reabsorção óssea na doença periodontal, especialmente porque estimula os osteoblastos e células do estroma a expressarem RANKL²¹.

Em relação à NOSi, um estudo anterior³⁰ também demonstrou que a desipramina atenuou a expressão do gene NOSi, e sugeriu um papel neuroprotetor do fármaco a doença inflamatórias. Por outro lado, o estudo *in vitro* de Veluthakal *et al.* (2006) não observou efeitos da desipramina sobre a expressão de NOSi ou a produção de NO em estudo com células pancreáticas induzidas por IL-1 β . Essas informações de estudos anteriores e o efeito da desipramina observado em nosso estudo sugerem que a desipramina pode influenciar de modo diferente a expressão de NOSi dependendo do modelo utilizado. A influência da desipramina sobre a expressão de COX-2, enzima responsável pela produção de PGE₂, foi investigada devido à capacidade dos inibidores da produção de COX-2 em reduzir a reabsorção óssea alveolar *in vivo*^{28,31}. O estudo de Zeidan *et al.* (2006) observou redução da produção de PGE₂ após tratamento de fibroblastos *in vitro* com a desipramina, entretanto os estudos avaliando os efeitos da desipramina sobre a PGE₂ são escassos. Nossos resultados mostraram que a desipramina parece atenuar a produção de COX-2 em tecido gengival em comparação

ao grupo ligadura, entretanto sua influência positiva não foi estatisticamente significativa no presente estudo.

Vários estudos apontam que as MMPs constituem vias importantes na destruição tecidual em doença periodontal e, juntamente com os TIMPs, tem um papel-chave na integridade do colágeno^{15,19}. A desipramina não influenciou significativamente a expressão de MMP-9 quando comparada ao grupo ligadura no presente estudo, porém modulou a expressão do TIMP estudado, apresentando perfil estatisticamente igual ao grupo controle (sem doença).

De forma semelhante ao que foi observado em relação ao TIMP-1 no grupo ligadura do presente estudo, outros autores observaram aumento da expressão de TIMP-1 em periodontite crônica, estando reduzidas em tecido gengival de indivíduos saudáveis²⁵. Benekareddy *et al.* (2008), estudando os efeitos de fármacos antidepressivos de diferentes classes sobre a expressão de MMP-9 e TIMPs em hipocampo de ratos, observaram que a desipramina não influenciou a expressão de MMP-9 e TIMPs 1 e 2, porém os autores observaram diferentes efeitos do fármaco sobre a TIMP-4 quando administrado de forma aguda ou crônica.

Pode-se especular que a ausência de influência sobre a expressão de MMP-9, bem como a redução de TIMP-1 promovida pela desipramina, tenham sido responsáveis, pelo menos em parte, pela ausência de influência positiva sobre a integridade das fibras colágenas no tecido conjuntivo gengival observado no presente estudo. No entanto, os efeitos da desipramina sobre os TIMPs devem ser melhor investigados, considerando que esses mediadores são considerados proteínas multifaciais por apresentarem outras atividades independentes de MMPs, incluindo ações mitogênicas e anti-apoptóticas²⁴. Uma vez que os efeitos da desipramina sobre MMPs e TIMPs, (bem como sobre COX-2 e NOSi), em modelo de inflamação periférica não estão bem elucidados, sugere-se que

mais investigações sejam realizadas para verificar seu papel sobre a modulação desses mediadores em outras doenças inflamatórias *in vivo*, bem como suas implicações clínicas.

Os estudos com desipramina e outros fármacos antidepressivos tem demonstrado uma diferença de atividade dos agentes quando administrados em diferentes doses em modelos de inflamação. Por exemplo, um outro estudo com modelo de colite ulcerativa em ratos avaliou duas doses de desipramina (10 e 20 mg/ kg ao dia administrados durante 2 semanas) e encontrou que, nas diferentes doses, a desipramina reduziu os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β ¹⁸. Entretanto, a maior dose utilizada de desipramina (20mg/ kg) produziu maior diminuição dos níveis de TNF- α ¹⁸. Considerando esses achados, acreditamos que novas investigações, em modelo animal de doença periodontal, sejam necessárias para avaliar se doses menores poderiam levar a novos resultados.

Quanto ao seu valor terapêutico, a desipramina, assim como outros tratamentos farmacológicos, apresentam alguns efeitos colaterais. Pacientes que fazem uso da desipramina, como antidepressivo, relatam sentir enjôos, sonolência, secura na boca, cefaléias, náuseas, cansaço ou debilidade, sabor desagradável e perda de peso⁵. No entanto, os efeitos colaterais são passageiros, se a dosagem correta é usada, e a desipramina se mostra segura e tolerada pelos pacientes (Szpunar *et al.*, 2013).

Os estudos com antidepressivos em modelo de doença periodontal são escassos, e os resultados dos poucos estudos existentes sugerem ações específicas diferentes de imuno-modulação para cada fármaco antidepressivo^{10,9}. Ao avaliarem os efeitos anti-inflamatórios e sobre a perda óssea da venlafaxina, outro inibidor da recaptação de norepinefrina, observaram um efeito inverso, no qual a venlafaxina aumentou a reabsorção óssea em doença periodontal induzida por ligadura, e sugeriram que os

resultados estivessem relacionados ao aumento de serotonina tecidual pela venlafaxina¹⁰. Isto porque o estudo de Bonnet *et al.* (2007) sugeriram efeitos ósseos deletérios relacionados aos inibidores seletivos da receptação de serotonina, embora não tenham observado tais efeitos deletérios com a desipramina.

Por outro lado, um inibidor da recaptção de serotonina estudado anteriormente pelo nosso grupo também apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de doença periodontal⁹. Esses resultados indicam que a atividade anti-inflamatória ou imunomoduladora dos antidepressivos parecem não estar relacionados diretamente ao aumento das concentrações de serotonina e/ou norepinefrina teciduais. Ainda, embora a norepinefrina tenha um papel regulador das respostas imunes, existe uma escassez de estudos avaliando se as ações anti-inflamatórias/imuno-moduladoras da desipramina estão relacionadas à inibição da recaptção de norepinefrina e consequente aumento dos níveis de norepinefrina tecidual¹⁴.

Os efeitos anti-inflamatórios da desipramina podem estar relacionados com a inibição da ativação da esfingomielinase ácida e da ceramidase¹² e a inibição do NF- κ B³⁰.

O NF- κ B é um fator de transcrição formado por uma família de proteínas que quando ativado leva também a ativação de mecanismos da expressão gênica que comandam a inflamação³⁰. Em um estudo com injeção de LPS em ratos tratados com inibidores da recaptção de norepinefrina, a desipramina e atomoxetina, observou que as ações anti-inflamatórias desses inibidores foram associados com a ativação reduzida do NF- κ B, sugerindo que a administração *in vivo* desses inibidores limita os fenômenos inflamatórios no cérebro³⁰.

A esfingomielinase ácida é uma das enzimas que compõem a família esfingomielinase, responsável por catalisar a decomposição de esfingomielina a

ceramida¹¹. Vários estudos sustentam a idéia de que uma ativação de esfingomielinases e um posterior aumento da concentração do mediador lipídico bioativo ceramida são críticos nos estímulos inflamatórios e na indução da apoptose durante a inflamação^{11,42}.

A terapia de modulação da resposta do hospedeiro em doença periodontal tem sido indicada como coadjuvante do tratamento convencional e apenas para pacientes específicos, incluindo pacientes com periodontite agressiva, periodontite recorrente ou refratária, em pacientes fumantes ou com predisposição genética forte²⁹. A desipramina poderia ser utilizada na terapia periodontal na maioria desses grupos de pacientes, entretanto deveria ser contra-indicada (ou utilizada com precaução) em pacientes portadores de cardiopatias, hipertensão arterial ou diabetes mellitus, por levar ao aumento das concentrações sanguíneas de norepinefrina²⁹.

Conclusão

Conclui-se que a desipramina reduziu a expressão de IL-1 β , NOSi e TIMP-1, bem como a reabsorção óssea em doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Os dados encontrados no nosso estudo deverão ser úteis em novas investigações, e sugerem que a desipramina deva continuar sendo investigada como um possível fármaco modulador da resposta do hospedeiro em doença periodontal.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo nº 2008/00566-6) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA Processos nº 1818/2012 e 125302/2013).

Referências

- 1 Abdel-Salam OM, Nofal SM, El-Shenawy SM. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res.* 2003 48(2):157-65.
- 2 Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*, June 2008, vol 79, n 6.
- 3 Aquino SC, Leite FRM, Machado DRS, Silva JAS, Spolidorio LC, Jr CR. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sciences* 84, 2009, 745–754.
- 4 Axelsson P, Nystrom B, Lindhe, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 749-757.
- 5 Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Goodman GA, Rall TTW, Nies AS, Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol. 8. New York: Pergamon Press; 1990:383-435.
- 6 Benekareddy M, Mehrotra P, Kulkarni VA, et al. Antidepressant treatments regulate matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2/MMP-9) and tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPS 1–4) in the adult rat hippocampus. *Synapse.* 2008; 62(8):590–600.
- 7 Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, De Carlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197-250.
- 8 Branco-de-Almeida LS, Kajiyama M, Cardoso CR, Silva MJ, Ohta K, Rosalen PL, Franco GC, Han X, Taubman MA, Kawai T. Selective serotonin reuptake inhibitors

attenuate the antigen presentation from dendritic cells to effector T lymphocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Aug;62(3):283-94.

9 Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, Kajiya M, Kawai T, Rosalen PL. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2012 May;83(5):664-71.

10 Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D et al. Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 15; 221(1): 111-8.

11 Carvalho R, Souza C, Neves J, Pinto S, Pinto L, Brito G, Andrade G. Effect of Venlafaxine on Bone Loss Associated With Ligature-Induced Periodontitis in Wistar Rats. *Journal of Negative Results in BioMedicine* 2010, 9:3.

12 Claus R, Bunck A, Bockmeyer C, Brunkhorst I, Losche W, Kinscherf R, Deigner H. Role of Increased Sphingomyelinase Activity in Apoptosis and Organ Failure of Patients with Severe Sepsis. *The FASEB Journal* express article. Published online July 28, 2005.

13 Diamond M, Kelly JP, Connor TJ. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2006 Oct;16(7):481-90.

14 Elenkov I, Wilder R, Chrousos G, Vizi S. The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System. *Pharmacol Rev* 52:595–638, 2000.

15 Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially

regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004; 31:671–679.

16 Graves DT, Fine D, Teng Y-TA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host–bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 89–105.

17 Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 1994 263:1618–1623.

18 Guemei AA, El Din NM, Baraka AM, El Said Darwish I. Do desipramine [10,11-dihydro-5-[3-(methylamino) propyl]-5H-dibenz[b,f]azepine monohydrochloride] and fluoxetine[N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]-propan-1-amine] ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats? *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Dec;327(3):846-50.

19 Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65:1–13.

20 Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res*. 2008; 87:456–460.

21 Kajiya, M; Giro, G; Taubman, M; Han, X; Mayer, M; Kawai, T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal of Oral Microbiology*, 2010.

22 Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 294-315.

23 Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 33-53.

- 24 Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49 (2004) 187–198.
- 25 Letra A, Silva R, Rylands R, Silveira E, Souza AP, Wendell S, Garlet G, Vieira, A. *MMP3* and *TIMP1* variants contribute to chronic periodontitis and may be implicated in disease progression. *J Clin Periodontol.* 2012 August ; 39(8): 707–716.
- 26 Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):727-52.
- 27 Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 1998 123:353-360.
- 28 Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol.* 1993; 64:432–444.
- 29 Oringer RJ. Modulation of the host response in periodontal therapy. Research, Science, and Therapy Committee of the American. Academy of Periodontology. *J Periodontol.* 2002; 73(6): 684]. *J Periodontol.* 2002;73(4):460-70.
- 30 O’Sullivan, J; Ryan, K ; Curtin, N; Harkin, A; Connor, T. Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2009), 12, 687–699.
- 31 Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, antiinflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8:12–37.
- 32 Rich L, Whittaker P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci.* 2005; 22:97–104.

- 33 Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, et al. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol.* 2008; 39:275–282.
- 34 Roumestan C, Michel A, Bichon F, Portet K, Detoc M, Henriquet C et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir Res.* 2007;8:35.
- 35 Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol2000.* 1997; 14: 158-172.
- 36 Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(Suppl 4):3-10.
- 37 Struillou X, Boutigny H, Soueiden A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *The Open Dentistry Journal,* 2010, 4, 37-47.
- 38 Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 125_35.
- 39 Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41.
- Taubman 2007
- 40 Tonetti MS, Steffen P, Muller-Campanile V, Suvan J, Lang NP. Initial extractions and tooth loss during supportive care in a periodontal population seeking comprehensive care. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 824-831.
- 41 Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Den Res.* 2003; 82(2): 82-90.
- 42 Veluthakal, R; Jangati, G; Kowluru, A. IL-1beta-Induced iNOS Expression, NO Release and Loss in Metabolic Cell Viability Are Resistant to Inhibitors of Ceramide

Synthase and Sphingomyelinase in INS 832/13 Cells. JOP. J Pancreas (Online) 2006; 7(6):593-601.

43 Zeidan Y, Pettus B, Elojeimy S, Taha T, Obeid L, Kwamori T, Norris J, Hannun Y. Acid Ceramidase but Not Acid Sphingomyelinase Is Required for Tumor Necrosis Factor- α -induced PGE₂ Production. The Journal of Biological Chemistry. August 25, 2006.

Legendas das figuras

Figura 1. Efeito da desipramina sobre a reabsorção óssea em doença periodontal induzida por ligadura. A, B e C são cortes histológicos representativos da região de furca dos primeiros molares de animais dos três grupos experimentais (coloração com hematoxilina e eosina; aumentos originais de 50x). **A** – Fotomicrografia ilustrando o ligamento periodontal na região de furca de um dente sem ligadura no **grupo controle** (animais tratados com gavagem diária de solução salina); **B** – Fotomicrografia ilustrando perda óssea na região de furca de um dente submetido à colocação de ligadura do **grupo ligadura** (animais tratados com gavagem diária de solução salina); **C** – Fotomicrografia ilustrando perda óssea na região de furca de um dente submetido à colocação de ligadura do **grupo desipramina** (animais tratados com gavagem diária de desipramina 20mg/kg durante 15 dias). **D** – A administração oral de desipramina diminuiu a reabsorção óssea alveolar; os resultados estão expressos, no gráfico, como média \pm desvio-padrão das áreas correspondentes ao ligamento periodontal ou à reabsorção óssea (mm^2) de dentes sem e com ligadura, respectivamente ($n = 10$ animais/grupo); letras diferentes no topo de cada barra do gráfico indicam diferenças estatísticas (A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P < 0,01$; ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 2. Efeito da desipramina sobre a integridade do colágeno em tecido conjuntivo gengival. As figuras A, B e C são cortes histológicos representativos de fibras colágenas marcadas em amostras dos três grupos experimentais (coloração de vermelho de picrossírius; aumentos originais de 400x). **A** – fibras colágenas do tecido conjuntivo em torno de um dente sem ligadura do **grupo controle** (animais tratados com gavagem diária de solução salina); **B** – fibras colágenas do tecido conjuntivo em torno de um dente com ligadura do **grupo ligadura** (animais tratados com gavagem diária de solução salina); **C** – fibras colágenas do tecido conjuntivo em torno de um dente com ligadura do **grupo desipramina** (animais tratados com gavagem diária de desipramina 20mg/kg). **D** – A

administração oral de desipramina não foi capaz de preservar a integridade das fibras colágenas no tecido conjuntivo gengival após indução da doença periodontal; os resultados estão expressos, no gráfico, como média \pm desvio-padrão das áreas (%) correspondentes às fibras colágenas marcadas (n = 10 animais/ grupo); letras diferentes no topo de cada barra do gráfico indicam diferenças estatísticas (A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P > 0,05$; ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 3. Níveis do RNAm de IL-1 β , COX-2, NOS, MMP-9 e TIMP-1 nos tecidos gengivais obtidos dos grupos controle, ligadura e desipramina. As amostras foram coletadas 3 dias após indução de doença periodontal e tratamento com solução salina ou desipramina. A expressão gênica foi detectada utilizando-se RT-PCR, e os resultados foram obtidos considerando-se a expressão relativa de RNAm de cada gene-alvo em comparação ao GAPDH. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão (n = 10 animais por grupo). Letras diferentes no topo de cada barra do gráfico indicam diferenças estatísticas (IL-1 β : A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P < 0,05$; COX-2: A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P > 0,05$; NOS: A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P < 0,05$; MMP-9: A vs. B, $P < 0,01$; A vs. C, $P < 0,01$; B vs. C, $P > 0,05$; TIMP-1: A vs. B, $P < 0,05$; A vs. C, $P > 0,05$; B vs. C, $P < 0,01$; ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figuras

Figura 1

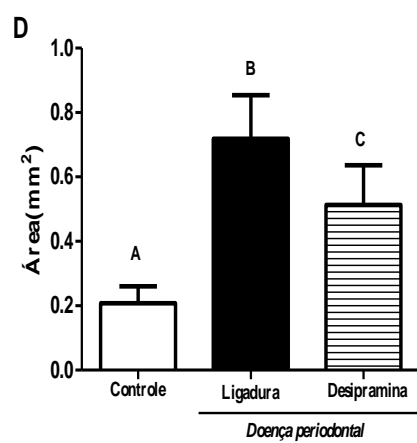
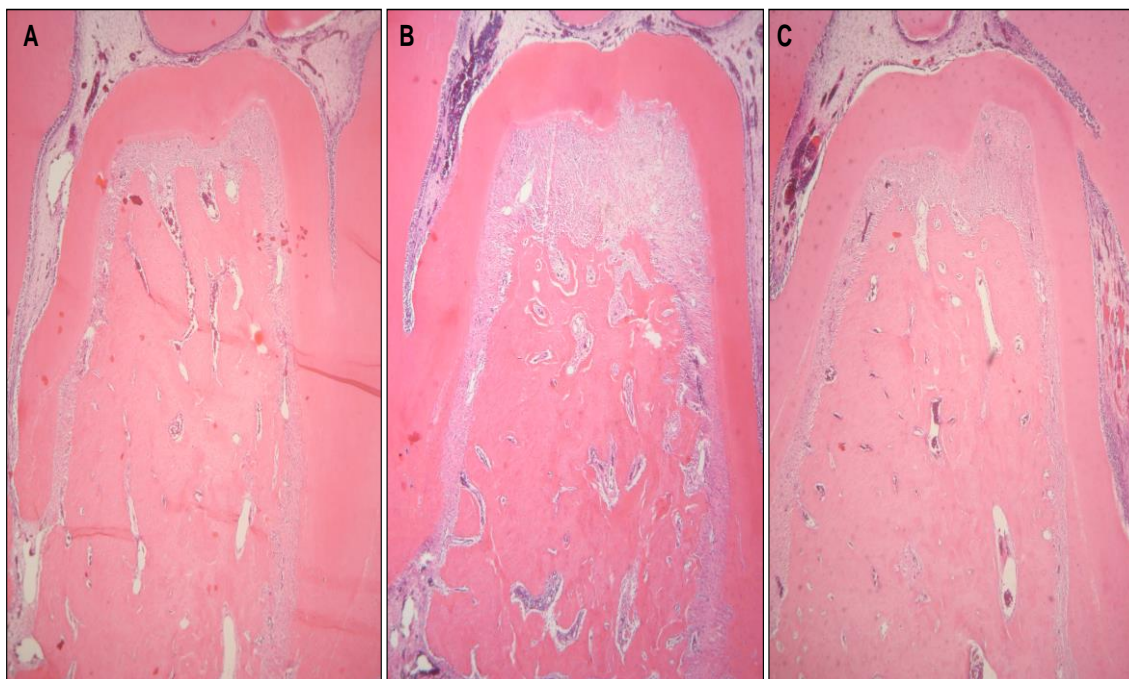


Figura 2

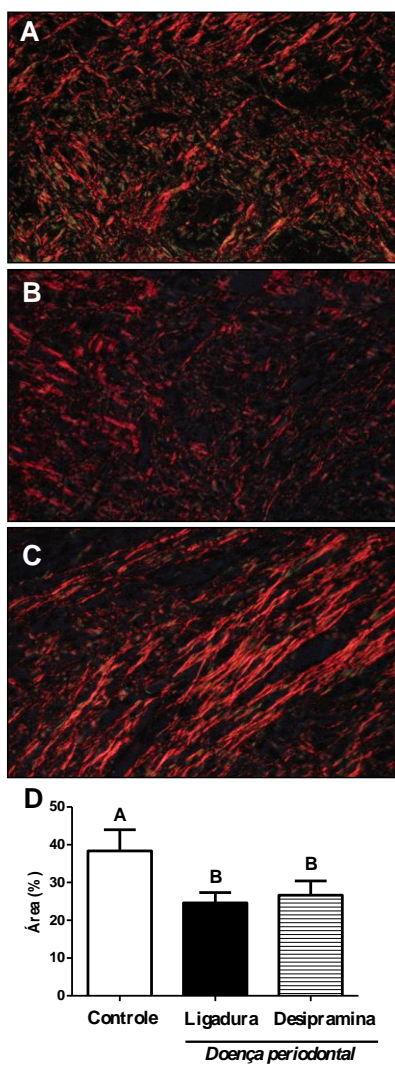
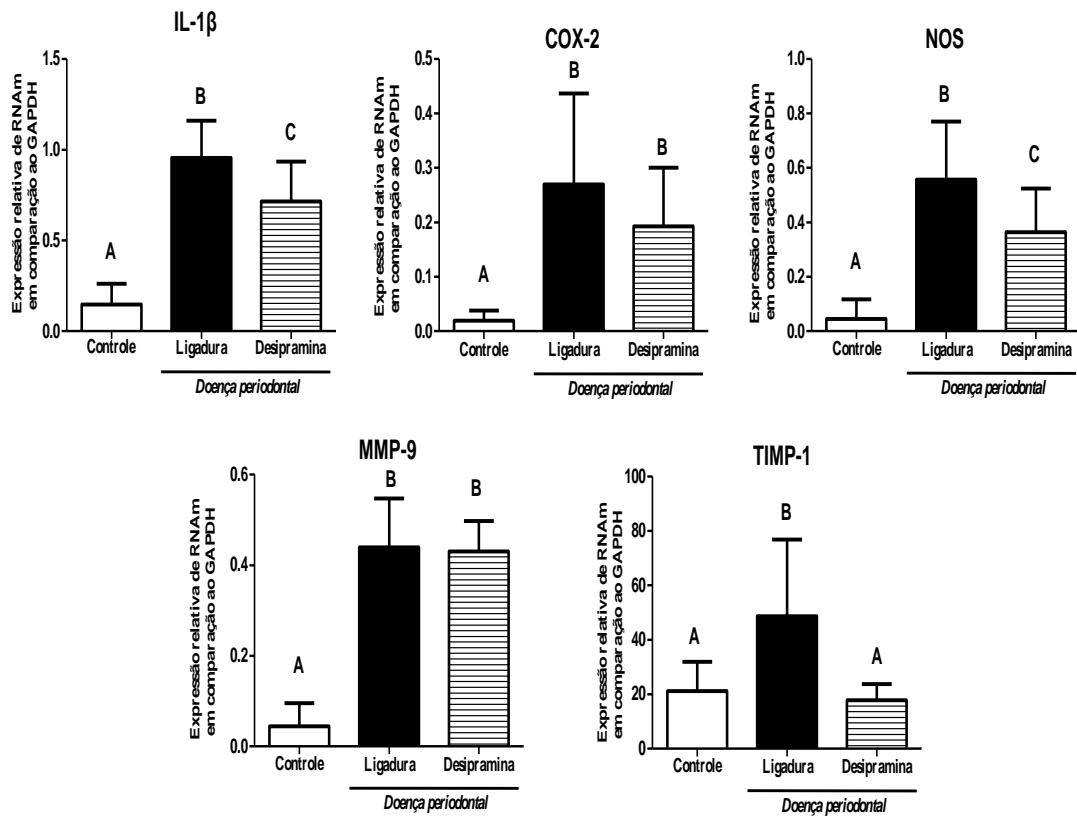


Figura 3



3 Conclusão

Podemos concluir que a desipramina reduziu a expressão de IL-1 β , NOSi e TIMP-1, bem como a reabsorção óssea periodontal, sem alterar a expressão de fibras colágenas no tecido gengival. Os dados encontrados no nosso estudo deverão ser úteis em novas investigações, e sugerem que a desipramina deva ser investigada como um possível fármaco modulador da resposta do hospedeiro em doença periodontal.

4 Referências

- 1 Abdel-Salam OM, Nofal SM, El-Shenawy SM. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res.* 2003 48(2):157-65.
- 2 Assuma, R; Oates, T; Cochran, D; Amar, S and Graves, D.T. Inflammatory response and bone loss in IL-1 and TNF antagonists inhibit the experimental periodontitis. *J. Immunol.* 1998;160:403-409.
- 3 Axelsson P, Nystrom B, Lindhe, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 749-757.
- 4 Bezerra M, Lima V, Alenca V, Vieira I, Brito G, Ribeiro R, Rocha, F. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2000,June.

- 5 Branco-de-Almeida LS, Kajiya M, Cardoso CR, Silva MJ, Ohta K, Rosalen PL, Franco GC, Han X, Taubman MA, Kawai T. Selective serotonin reuptake inhibitors attenuate the antigen presentation from dendritic cells to effector T lymphocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Aug;62(3):283-94.
- 6 Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, Kajiya M, Kawai T, Rosalen PL. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2012 May;83(5):664-71.
- 7 Caton Jack, Ryan Maria Emanuel. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacological Research* 63 (2011) 114–120.
- 8 Ciancio SG. Systemic medications: clinical significance in periodontics. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 Suppl2: 17-21.
- 9 Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31. Epub 2002 Sep 19.
- 10 Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, de Carvalho-Filho J, Franco GC. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1332_29.
- 11** Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M, et al. The “Cyclic” regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: A Preliminary Study. *J. Periodontol.*, Virginia, v. 67, n. 5, p. 506-514. May 1996.

- 12 Diamond M, Kelly JP, Connor TJ. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2006 Oct;16(7):481-90.
- 13 Fernandes M, Gaio E, Oppermann R, Rados P, Rosing, C. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2007;21(3):216-21.
- 14 Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology.* 2004; 31:671–679.
- 15 Grevstad HJ, BOE OE, Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. *J. Oral Sciences, Bergen*, v. 103, n. 3, p. 156-159, Jan. 1995.
- 16 Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2007; 43: 294-315.
- 17 Guemei AA, El Din NM, Baraka AM, El Said Darwish I. Do desipramine [10,11-dihydro-5-[3-(methylamino) propyl]-5H-dibenz[b,f]azepine monohydrochloride] and fluoxetine[N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]-propan-1-amine] ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats? *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Dec;327(3):846-50.
- 18 Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65:1–13.
- 19 Heasman PA, Seymour RA, Boston PF. The effect of a topical non-steroidal anti-inflammatory drug on the development of experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol.* 1989; 16(6): 353-8.

- 20 Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect Immun* 2002; 70: 2512_8.
- 21 Kohm, Adam; Sanders, Virginia. Norepinephrine and β 2 Adrenergic Receptor Stimulation Regulate CD4+ T and B Lymphocyte Function in Vitro and in Vivo. *Pharmacol Rev* 53:487–525, 2001.
- 22 Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999; 402(6759): 304-9.
- 23 Llawaneras A, Ramamurthy NS, Heikkila P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J. Periodontol.*, Caracas v. 72, n. 8, p. 1069-1077, Aug. 2001.
- 24 Lee HM, Ciancio SG, Tuter G, Ryan ME, Komaroff E, Golub LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol*. 2004; 75(3):453-63.
- 25 Liu XW, Bernando MM, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic death via focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and mapk signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003; 278:40364-40372.
- 26 Ng VW, Bissada NF. Clinical evaluation of systemic doxycycline and ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis. *J Periodontol*. 1998;69(7):772-6.

- 27 Novak MJ, Donley TG. Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2002;14(9 Suppl):3-11.
- 28 Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993; 64:432-444.
- 29 Ogata Y, Itoh Y, Nagase H. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (gelatinase b)-tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem*. 1995; 270:18506-18511.
- 30 Page RC, Schroeder HE. *Periodontitis in man and other animals: A comparative review*. New York: Karger, 1982.
- 31 Petitfrere E, Kadri Z, Boudot C, Sowa ML, Mayeux P, Haye B Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue inhibitor of metalloproteinases-1- induced erythroid differentiation. *Febs Lett*. 2000; 485:117-121.
- 32 Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, antiinflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003; 8:12-37.
- 33 Roumestan C, Michel A, Bichon F, Portet K, Detoc M, Henriquet C et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir Res*. 2007;8:35.
- 34 Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32(Suppl 6):108-29.
- 35 Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(Suppl 4):3-10.
- 36 Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44.

- 37 Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological consideration in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000* 1999; 20: 341_62.
- 38Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41.
- 39Tonetti MS, Steffen P, Muller-Campanile V, Suvan J, Lang NP. Initial extractions and tooth loss during supportive care in a periodontal population seeking comprehensive care. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 824-831.
- 40Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Den Res*. 2003; 82(2): 82-90.
- 41Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25.
- 42Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, Hosoya A, Ozawa H, Lesot H. Differential regulation of TIMP-1, -2, and -3 mRNA and protein expressions during mouse incisor development. *Cell Tissue Res*.2006; 324(1):97-104.
- 43 Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cellmediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000* 1999; 20: 239_88.

Anexos

Anexo 1- Comitê de ética



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

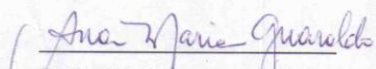
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1499-1**, sobre "**Estudo *in vivo* da atividade da fluoxetina e da desipramina sobre a modulação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro na doença periodontal**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen / Prof. Dr. Gilson César Franco / Luciana Salles Branco de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **28 de abril de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1499-1**, entitled "**In vivo evaluation of the activity of fluoxetine and desipramine in host response in periodontal disease**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **April 28, 2008**.

Campinas, 28 de abril de 2008.


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 2- Normas das Revista

