



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EVELINE VALERIANO MOURA

**EFEITO DA ATORVASTATINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM
RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE
SUJEITAS A PERIODONTITE**

SOBRAL
2014

EVELINE VALERIANO MOURA

**EFEITO DA ATORVASTATINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM
RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE
SUJEITAS A PERIODONTITE**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de Concentração: Inflamação e Dor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Goes

SOBRAL
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Curso de Medicina de Sobral

-
- M885c Moura, Eveline Valeriano.
 Efeito da atorvastatina na reabsorção óssea inflamatória em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide e submetidas à periodontite. / Eveline Valeriano Moura. – 2015.
 51 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina *Campus* de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2015.
 Área de Concentração: Inflamação e dor.
 Orientação: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra.

1. Doenças periodontais. 2. Dexametasona. I. Título.

CDD 616.0473

Dedicatória

A Roberto Ivo Moura (meu pai)

“... Pai
Pode crer eu tô bem, eu vou indo
Tô tentando vivendo e pedindo
Com loucura pra você renascer

Pai
Eu não faço questão de ser tudo
Só não quero e não vou ficar mudo
Pra falar de amor pra você

....

Pai
Eu cresci e não houve outro jeito
Quero só recostar no teu peito
Pra pedir pra você ir lá em casa
E brincar de vovô com meu filho
No tapete da sala de estar

Pai
Você foi meu herói, meu bandido
Hoje é mais muito mais que um amigo
Nem você, nem ninguém tá sozinho
Você faz parte desse caminho
Que hoje eu sigo em paz...”

(Fábio Jr.)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente aos meus pais Roberto e Hosana, pela parceria e apoio constantes. Pela participação positiva no meu dia a dia, sempre me mostrando o melhor caminho, sempre guiando os meus passos, mesmo à distância. Vocês são o motivo de eu vibrar cada minuto da minha vida.

Ao meu marido Tarcísio, pela paciência e carinho que me dedica. Nos momentos de cansaço quando me estendeu sua mão, e tantas foram as vezes em que me senti segura ao seu lado... Te amo!

À minha irmã Aline, meu xodó, minha amiga- irmã. Que apesar de ser a caçula da casa, muitas vezes me ensina lições de perseverança. Ao meu sobrinho João Pedro, que adoça meu dia, com sua inocência.

À minha sogra Lúcia Prado, mulher de coragem e fé. Em quem eu descobri o conforto de uma “mãe postiça”.

A todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra Paula Goes, modelo de professora, dedicada, inteligente e esforçada. Quantos foram os ensinamentos que obtive neste período, quantas foram as boas críticas a fim de construir a minha formação, e que levarei sempre na memória.

Aos professores Gerardo Cristino, Mirna, Paulo Roberto por sua inestimável contribuição na realização das diversas fases deste estudo.

À mestranda Luzia por sua colaboração sem igual nos experimentos, sempre se prontificando a participar das atividades.

Aos estudantes da graduação por suas colaborações voluntárias em vários experimentos.

À bioterista e doutoranda Jordânia, aos zeladores da Famed, aos técnicos da Histologia, por suas disponibilidades e disposição em facilitar os acessos e processamentos dos experimentos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro a este estudo.

Ao CEO pela cessão das radiografias digitais.

Em suma, a todos que contribuíram de alguma forma.

Lista de Abreviaturas

OPG- osteoprotegerina

POA- perda óssea alveolar

GIOP- osteoporose induzida por glicocorticóide

PD- periodontite

ATV- atorvastatina

FAO- fosfatase alcalina óssea

HMG- CoA- hidroximetil- coenzima A

TRAP

TGO-

TGP

RESUMO

Efeito da atorvastatina na perda óssea inflamatória em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóides. EVELINE VALERIANO MOURA. Dissertação Submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Inflamação e Dor. Aprovação em 2013. Orientadora: Profa. Dra. Paula Goes.

A doença Periodontal (PD) é uma doença inflamatória que pode ser potencializada por condições sistêmicas severas, especialmente a osteoporose. A osteoporose induzida por glicocorticóide (GIOP) é uma importante causa de osteoporose secundária. A Atorvastatina (ATV), é uma droga hipolipemiante, que tem importantes efeitos pleiotrópicos tais como atividade antiinflamatória e anabólica óssea, que podem ser relevantes em prevenir a perda óssea na GIOP e PD. Este estudo avalia os efeitos da ATV na perda óssea alveolar em ratas com GIOP sujeitas a PD. GIOP foi induzida pela Administração de dexametasona 7 mg/kg 1x/semana por 5 semanas (i.m.). PD foi induzida pela ligadura ao redor da maxilla no Segundo molar de ratas por 11 dias. Grupos de 6 animais receberam salina oral ou ATV (27 mg/kg/day) até a eutanásia. A perda óssea alveolar foi determinada por análises macroscópicas e radiográficas. A Densidade Radiográfica (RD) do femur foi analisada. Níveis séricos gengivais de TNF- α e IL-1 β foram investigados. Os níveis séricos de transaminases, fosfatase alcalina total (FAT) e fosfatase alcalina óssea (FAO) foram avaliadas. ATV preveniu a perda óssea alveolar, que foi comprovada pela redução da RD na hemimaxila e femur, mostrando efeito anti-reabsortivo. ATV reduziu os níveis séricos gengivais de TNF- α e IL-1 β e reverteu a leucocitose sistêmica e a neutrofilia. Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis séricos de transaminases. ATV (27 mg/kg) elevou a atividade de FAT e FAO, quando comparada com o grupo GIOP+PD, confirmando seu efeito anabólico ósseo. Estes dados sugerem que ATV previne perda óssea alveolar em GIOP+PD, que pode ser mediada pelo seu efeitos anti-reabsortivo, antiinflamatório e anabólico ósseo.

Palavras- chave: Atorvastatina; Perda Óssea; Periodontite; Osteoporose induzida por Glicocorticóide.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is an inflammatory disease that can be amplified by several systemic conditions specially osteoporosis. Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) is an important cause of secondary osteoporosis. Atorvastatin (ATV), a cholesterol-lowering drug, has shown important pleiotropic effects such as anti-inflammatory and bone anabolic activities that may be interesting to prevent bone loss in GIOP and PD. This study evaluates the effects of the ATV on alveolar bone loss in rats with GIOP subjected to PD. GIOP was induced by administration of dexamethasone 7 mg/kg once/week for 5 weeks (i.m.). PD was induced by ligature placement around the maxillary left second molar of rats per 11 days. Groups of 6 animals received oral saline or ATV (27 mg/kg/day) until the euthanasia. Alveolar bone loss was determined by macroscopic and radiographic analysis. Radiographic density (RD) of femur was analyzed. Gingival TNF- α and IL-1 β levels were investigated. The serum levels of transaminases, total alkaline phosphatase (TALP) and bone-specific alkaline phosphatase (BALP) were evaluated. ATV prevented alveolar bone loss, which was corroborated by RD reduction in hemimaxillae and femur, showing an anti-resorptive effect. ATV reduced the gingival levels of TNF- α and IL-1 β and reversed the systemic leukocytosis and neutrophilia. No difference was found in transaminases serum levels. ATV (27 mg/kg) increased the activity of TALP and BALP when compared to GIOP+PD group, confirming its anabolic bone effect. This data suggest that ATV prevents alveolar bone loss in GIOP+PD, which may be mediated by its anti-resorptive, anti-inflammatory and anabolic bone effects.

Keywords: Atorvastatin; Bone Loss; Periodontitis; Glucocorticoid-induced Osteoporosis.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| I - INTRODUÇÃO GERAL..... | 10 |
| II - PROPOSIÇÃO..... | 14 |
| III – ARTIGO CIENTÍFICO..... | 15 |
| EFEITO DA ATORVASTATINA NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE SUJEITAS A PERIODONTITE | 16 |
| V - DISCUSSÃO GERAL..... | 57 |
| VI - CONCLUSÕES GERAIS..... | 64 |
| VII - REFERÊNCIAS..... | 65 |
| ANEXO..... | 75 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória prevalente que afeta os tecidos de suporte dental.² A etiologia é multifatorial, mas o biofilme é um importante fator que inicia a doença. No entanto, os processos inflamatórios, que produzem citocinas, as metaloproteinases de matriz (MMPs), entre outros, levam à perda óssea.

A reabsorção óssea alveolar é uma medida e consequência da periodontite severa. (Humphrey 2008). Considerando-se que a resposta do hospedeiro é importante para início e progressão da perda óssea inflamatória, visto na periodontite, a literatura recente tem estudado a participação de doenças sistêmicas que interferem no processo imune/inflamatório do hospedeiro e por consequência no periodontite.^{2,3} Neste contexto, muitas doenças, tais como diabetes, doenças renais crônicas, dentre outras, têm sido apontados. A osteoporose pode ser diagnosticada se houver baixa densidade mineral óssea, com causas secundárias (terapia com glicocorticóides, hipogonadismo e hiperparatireoidismo) (Beyu 2014). A osteoporose induzida por glicocorticóides (GIOP) tem destaque, considerando-se o uso amplo e crônico desta droga e seus efeitos adversos.⁴

A osteoporose é uma doença crônica bastante prevalente, geralmente assintomática, até surgirem suas complicações. Pacientes que sofrem desta doença necessitam utilizar inúmeras medicações para seu tratamento. É conhecida como doença sistêmica com redução da massa óssea e degeneração da microarquitetura óssea, que facilmente leva a aumento do risco de fratura. A dislipidemia, largamente vista como fator de risco para doenças cardiovasculares, tem sido atribuída como associada a mudanças na massa óssea. (Chen 2013)

Os glicocorticóides (GCs) têm sido amplamente utilizados na prática clínica, para o tratamento de doenças reumatológicas, principalmente devido a seus efeitos imunossupressores.⁵ Entretanto, a longo prazo e / ou a após a utilização de altas doses dos GCs, estes podem induzir o desenvolvimento de osteoporose, um importante efeito adverso. GIOP é caracterizada pela diminuição da massa óssea aumentando a fragilidade óssea, o que leva às altas taxas de morbidade entre pacientes.⁴ Os osteoblastos são as principais células afetadas em GIOP, juntamente com as células de gordura se originam a partir de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs). Os GCs promovem a diferenciação de BMMSCs em adipócitos, ao mesmo tempo em que inibem a diferenciação em BMMSCs, conduzindo assim a um

desequilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos, promovendo perda óssea.⁶ Esta condição em um paciente com periodontite pode ser ainda pior, uma vez que é bem conhecido que os mediadores inflamatórios, relacionados com a periodontite, como TNF e interleucinas podem interferir no eixo RANK-RANKL-OPG favorecendo osteoclastogênese.⁶

Os glicocorticóides com frequência são lembrados como drogas antigas, mas que ainda são bem utilizadas, devido às suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras (De Nijs et al., 2008). Estão bem indicados nas doenças inflamatórias intestinais, doenças reumatológicas, nefropatias, e na oncologia (Peat et al., 1995). Os efeitos colaterais são bem conhecidos, e um dos mais importantes é a perda óssea, mesmo em baixas doses. Uma vez estabelecido, é difícil reverter este processo (Peat et al., 1995). O mecanismo de ação ocorre pela inibição da função dos osteoblastos, levando ao decréscimo da formação óssea, enfraquecimento da arquitetura e consequente redução da densidade mineral óssea e risco de fraturas (De Nijs et al., 2008). A perda óssea tem início com 3 meses e seu pico ocorre após 6 meses de tratamento (Grossman et al., 2010). É evidenciada principalmente em ossos com alto teor trabecular como vértebras.

O risco de osteoporose induzida por glicocorticóide pode ser reduzido com o uso da menor dose e num curto período de tempo (De Nijs et al., 2008). Entretanto, há outros fatores que interagem na perda óssea induzida por glicocorticóides tais como: sexo e idade, história familiar de fraturas, uso de álcool, tabagismo, baixo IMC, pulsoterapia intravenosa (Grossman et al., 2010).

Inúmeras medidas são recomendadas na prevenção e no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóides, tais como: evitar fumo e álcool, ingestão de alimentos ricos em cálcio e Vitamina D, calcitonina, bifosfonados, suplementos de cálcio, análogos de Vitamina D, Terapias Hormonais (Peat et al., 1995). Entretanto, até o momento, não há nenhum consenso sobre como ou quando estes agentes devem ser introduzidos na prática clínica.

Desta forma, considerando o caráter inflamatório do uso de glicocorticóide na perda óssea alveolar, parece ser interessante o emprego de novos agentes que possam interferir neste processo inflamatório e consequentemente modular o metabolismo ósseo.

Assim, considerando-se o efeito adverso dos GCs em osteoblastos e o papel da inflamação periodontal em osteoclastos, o estudo de meios farmacológicos que

modulem o metabolismo ósseo parece ser interessante. Neste caso, as estatinas podem ser uma ferramenta importante. A atorvastatina (ATV) é O metabolismo ósseo ... A reabsorção óssea alveolar é uma consequência da doença periodontal grave. As estatinas são utilizadas na prática clínica como hipolipemiantes.7O mecanismo de ação das estatinas envolve a inibição da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA) , enzima da via do mevalonato.8 Isto resulta no declínio dos níveis endógenos de colesterol e aumento dos níveis dos isoprenóides, uma substância envolvida no processo de sinalização celular, levando à alteração na transcrição e transdução da sinalização intracelular, o que em contrapartida tem impacto nas diversas funções celulares.9 Portanto, as estatinas têm mostrado interessantes efeitos pleiotrópicos, como imunomodulador, anti-oxidante, atividade anti-inflamatória e anabólico óssea.9 Estudos mostram efeitos positivos da estatina no tecido ósseo, em ambos animais e humanos, atuando na expressão da BMP-2, levando à diferenciação dos osteoblastos e interferindo na atividade dos osteoclastos (Chuengsamarn 2010). Entre os vários tipos de estatinas, a atorvastatina (ATV) tem destaque, porque é altamente hidrofóbica, apresentando efeitos.9 pleiotrópicos mais pronunciados. Desta forma, parece interessante estudar o efeito de ATV na perda óssea alveolar em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóides submetido a periodontite.

As estatinas são bem empregadas no tratamento de pacientes com fatores de risco cardiovasculares e na prevenção secundária da aterosclerose. Também apresentam atividade nos osteoblastos pelo aumento da síntese da proteína- 2, na formação óssea (Bone et al., 2007). O seu uso na prática clínica é bem tolerado independente da dose utilizada (Bone et al., 2007). As estatinas são consideradas como agindo na função dos osteoclastos por agirem em um novo sítio diferente do sítio que agem os bifosfonados (Mundy 1999), tendo a capacidade de anabolismo ósseo (Chan 2001).

A Atorvastatina (ATV) age como inibidor da enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG- CoA) (Pérez- Castrillon et al., 2008). Tem sido largamente utilizada na prevenção de eventos cardiovasculares, e além de ser um agente hipolipemiante, tem efeitos secundários, incluindo ação antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, antitrombótica e estabilizadora do endotélio, assim como ação na angiogênese e incremento da diferenciação dos osteoblastos (Goes et al, 2010).

Mesmo baixas doses de ATV mostram uma tendência à redução da perda óssea, que é tanto maior quanto maior a dose utilizada. Tem sido descrito que as estatinas reduzem a produção de muitas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-8, produzidas nas células epiteliais, assim como ação na resposta imune, protegendo o tecido ósseo da destruição (Pérez-Castrillon et al., 2008). Elevadas doses de ATV reduzem a inflamação periodontal, segundo estudos anteriores (Subramanian 2013), sugerindo seu efeito pleiotrópico. Sendo assim, evidenciam-se outros benefícios além de sua ação na aterosclerose, reduzindo a inflamação extra- arterial (Subramanian 2013). Outros estudos em humanos, mostraram que sinvastatina e ATV, em qualquer dose utilizadas por um ano, não tiveram nenhum efeito sobre os níveis de 25- hidroxivitamina D, mas tiveram efeito positivo na densidade mineral óssea.

Por outro lado, a ATV também é capaz de induzir o anabolismo ósseo, realizado pela proteína morfogenética 2 (BMP-2), aumentando o volume trabecular nas tíbias.

Portanto, considerando o efeito antiinflamatório da ATV, parece ser interessante avaliar o uso deste agente modulador do processo inflamatório na perda óssea.

Sabendo que a osteoporose apresenta importante base inflamatória, resultando em reabsorção óssea alveolar, e que esta doença é fator de risco para periodontite, aliado aos conhecimentos de que a Atorvastatina apresenta efeitos pleiotrópicos importantes tais como, efeito antiinflamatório e antirreabsortivo, parece-nos interessante investigar a atividade desta substância na perda óssea alveolar de ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide.

2- PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho, segundo o artigo relacionado adiante foram:

1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito antirreabsortivo da ATV em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide, sujeitas a periodontite
 - Análise macroscópica da perda óssea alveolar
 - Análise dos parâmetros sistêmicos tais como: leucograma, disfunção hepática através dosagem das transaminases (AST e ALT), bem como dosagem dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (FAT) e Óssea (FAO)

2. Objetivos Específicos

- Avaliação do efeito da Atorvastatina na densidade radiográfica alveolar em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide sujeitas a periodontite, através de:
 - Análise comparativa da densidade radiográfica e mensuração macroscópica da perda óssea alveolar

III – ARTIGOS CIENTÍFICOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, os protocolos utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação e devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará (Anexo 1).

Dessa forma, a presente dissertação é composta por artigo científico redigido de acordo com a revistas científica escolhida para a devida publicação, como apresentado adiante:

□ □ **Artigo:**

"Effect of Atorvastatin on alveolar bone loss in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis subjected to periodontitis". Goes P, Moura E.V, Teixeira L.H., Queiroz A. L, Isaias P. H. C, Linhares A. G, Rego R. O. C. C, Freitas R. S, Chaves H, Marques M. Este artigo seguiu normas de publicação do periódico *Journal of Periodontology* (ISSN 1600-0722).

ARTIGO

Effect of Atorvastatin on alveolar bone loss in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis subjected to periodontitis.

Eveline Moura, MD*, Luzia Herminia Teixeira, DDS*, Ana Larissa Queiroz, UGS[†], Pedro Henrique Chaves Isaias, UGS[†], Ana Giselle Linhares, USG[†], Rodrigo Otávio Cito César Rego, DDS, PhD[†], Raul Sousa Freitas, BMD[§], Hellíada Chaves, DDS, PhD^{*†}, Mirna Marques, DDS, PhD^{*‡}, Paula Goes, DDS, PhD^{*||}.

* Health Science Post-Graduation Program, Federal University of Ceará– UFC, Sobral/CE, Brazil.

[†]Dental School of Sobral, Federal University of Ceará– UFC, Sobral/CE, Brazil.

[‡] School of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará – UFC, Sobral/CE, Brazil.

[§] Biothecnology Post-Graduation Program, Federal University of Ceará– UFC, Sobral/CE, Brazil.

^{||} Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará – UFC, Fortaleza/CE, Brazil

Corresponding author: Paula Goes, E-mail address: paulagpinheiro@yahoo.com.br (e-mail can be published), Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará – UFC, Rua Monsenhor Furtado, S/N, 60.441-750, Rodolfo Teófilo, Fortaleza/CE, Brazil, phone number: +55-85-33668300

Word count: 3.692; Figures: 4; Tables: 2

Short running title: Effect of Atorvastatin in rats with GIOP and PD.

One-sentence summary: ATV prevents bone loss and reduces inflammation in GIOP and PD

ABSTRACT

Background: Periodontal disease (PD) is an inflammatory disease that can be amplified by several systemic conditions specially osteoporosis. Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) is an important cause of secondary osteoporosis. Atorvastatin (ATV), a cholesterol-lowering drug, has shown important pleiotropic effects such as anti-inflammatory and bone anabolic activities that may be interesting to prevent bone loss in GIOP and PD. This study evaluates the effects of the ATV on alveolar bone loss in rats with GIOP subjected to PD.

Methods: GIOP was induced by administration of dexamethasone 7 mg/kg once/week for 5 weeks (i.m.). PD was induced by ligature placement around the maxillary left second molar of rats per 11 days. Groups of 6 animals received oral saline or ATV (27 mg/kg/day) until the euthanasia. Alveolar bone loss was determined by macroscopic and radiographic analysis. Radiographic density (RD) of femur was analyzed. Gingival TNF- α and IL-1 β levels were investigated. The serum levels of transaminases, total alkaline phosphatase (TALP) and bone-specific alkaline phosphatase (BALP) were evaluated.

Results: ATV prevented alveolar bone loss, which was corroborated by RD reduction in hemimaxillae and femur, showing an anti-resorptive effect. ATV reduced the gingival levels of TNF- α and IL-1 β and reversed the systemic leukocytosis and neutrophilia. No difference was found in transaminases serum levels. ATV (27 mg/kg) increased the activity of TALP and BALP when compared to GIOP+PD group, confirming its anabolic bone effect.

Conclusions: This data suggest that ATV prevents alveolar bone loss in GIOP+PD, which may be mediated by its anti-resorptive, anti-inflammatory and anabolic bone effects.

KEYWORDS

Atorvastatin; Bone Loss; Periodontitis; Glucocorticoid-induced Osteoporosis.

INTRODUCTION

Periodontitis is a high prevalent infectious-inflammatory disease that affects the supportive dental tissues,¹ and presents a multifactorial etiology.² Dental biofilm is an important factor that initiates the disease, however the inflammatory processes, which produces cytokines, matrix metalloproteinases (MMPs), among others, leads to bone loss.

Considering that the host response has an important role on the initiation and progression of inflammatory bone loss, seen in periodontitis, recent literature has studied the participation of systemic disease that interfere on immune/inflammatory process of the host and by consequence on periodontitis.^{2,3} In this context, many diseases, such as diabetes, renal chronic diseases among many others, have been pointed out. Nevertheless, glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) is highlighted, considering the wide and chronic use of this drug and its adverse effect.⁴

Glucocorticoids (GCs) have been widely used in clinical practice, in order to treat mainly rheumatologic diseases, due to its immunosuppressive and anti-inflammatory effects.⁵ However, the long-term and/or high-dose use of GCs can induce the development of osteoporosis, an important adverse effect. GIOP is characterized by reduction of bone mass increasing bone fragility, which leads to high rates of morbidity among patients.⁴ Osteoblasts are the main affected cells in GIOP, along with the fat cells originated from the bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs). GCs promote the differentiation of BMMSCs into adipocytes by the time it inhibits osteoblast differentiation from BMMSCs, thus leading to an imbalance between osteoblast and osteoclasts, promoting bone loss.⁶ This condition in a patient with periodontitis may be even worse, because it is well known that inflammatory mediators, related to periodontitis, such as TNF and interleukins can interfere on RANK-RANKL-OPG axis favoring osteoclastogenesis.⁶

Thus, considering the adverse effect of GCs on osteoblast and the role of periodontal inflammation on osteoclast, the study of a pharmacological approach which can modulate bone metabolism seems interesting. In this case, statins can be an important tool. Statins are used on clinical practice in order to reduce cholesterol levels.⁷ The mechanism of action of statins involves the inhibition of hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase enzyme⁸ on mevalonate pathway. This results in decline of endogenous cholesterol and increase on isoprenoides levels, a substance involved in the process of cell signaling leading to alteration on transcription and transduction of intracellular signaling, which in turn hinder the action of effector proteins with impact on diverse cellular functions.⁹ Meanwhile, statins have shown interesting pleiotropic effects, as immunomodulatory, antioxidant, anti-inflammatory activity and anabolic bone effect.⁹ Among the several types of statins, Atorvastatin (ATV) points out, because it is highly hydrophobic and therefore presents more pronounced pleiotropic effects.⁹ In this way, it seems interesting to study the effect of ATV on the alveolar bone loss in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis subjected to periodontitis.

MATERIAL AND METHODS

Animal selection

24 females Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from our own facilities weighing 180-220 g, were used. These animals were acquired from Central Animal Facility of the Pici Campus – UFC and transferred to the Sector Animal Facility of the Faculty of Medicine – Sobral Campus, which were kept in appropriate cages in a number of 6 animals in each. The rats were acclimatized for 1 week before the assay and housed under normal conditions, in an environment with controlled temperature at $23 \pm 3^\circ\text{C}$, relative air humidity of $55 \pm 15\%$, and a 12 h light-dark cycle, with laboratory chow and water available ad libitum. The experimental protocols were performed following the recommendations presented in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHEW Publication, Bethesda, MD, USA). Experimental protocols were executed following the ethical principles for laboratory animal use and were approved by the Institutional Ethical Committee of Animal Research (protocol no. 49/2012). The animals were randomly divided into 4 groups: Periodontal disease (PD), Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP), Glucocorticoid-induced osteoporosis and periodontal disease (GIOP+PD),

Glucocorticoid-induced osteoporosis and periodontal disease treated with Atorvastatin(ATV).During the experiment, all participantswereblindedto the groups of animals.

Glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP)

For induction of osteoporosis, the animals received injections of glucocorticoid dexamethasone¹ at a dose of 7mg/kg once a week, for 5 weeks intramuscularly, once a week.¹⁰

Ligature-induced inflammatory bone loss

Alveolar bone loss was induced using the periodontal model, previously described,^{11,12,13} by placing a nylon ligature around the cervix of the second left upper molar of rats anesthetized and the ligature was knotted on the buccal side. The contralateral side was used as an unligated control (Normal group). Rats were observed for 11 days, the day of the most intense alveolar bone loss and then euthanized under anesthesia.^{11,12,13}

Experimental groups

- **Periodontal Disease group (PD):** Six animals received 0,5 ml of 0.9 % sterile saline solution (SAL) intramuscularly for 5 weeks (once a week). Then they received 2 ml/kg of 0,9 % SAL by gavage 30 min before ligature placement. The same volume of SAL was administered daily after ligature placement for more 11 days when the rats were euthanized.(Figure 1)
- **Glucocorticoid-induced osteoporosis group (GIOP):** Six animals were subjected to GIOP. Then these animals received 2 ml/kg of 0.9 % SAL by gavage 30 min before sham oral surgery, where no ligature was placed. The same volume of SAL was administered daily for 11 days, when the rats were euthanized.(Figure 1)
- **Glucocorticoid-induced osteoporosis+ Periodontal Disease group (GIOP + PD):** Six animals were subjected to GIOP. Then these animals received 2 ml/kg of 0.9% SAL by gavage 30 min before ligature placement. The same volume of SAL was administered daily, after ligature placement, for 11 days when the rats were euthanized.(Figure 1)

- **Atorvastatin group (GIOP + PD + ATV):** Six animals were subjected to GIOP. Then these animals received 27 mg/kg of ATV[#] by gavage 30 min before ligature placement.¹³. The same dose of ATV was administered daily after ligature placement until day 11, when the rats were euthanized. (Figure 1)

Morphometric analysis of alveolar bone tissue

The maxillae were removed on day 11 after ligature placement and fixed, for 24 h, in 10% formaldehyde^{**}. Morphometric analysis was performed as follows: the maxillae were separated in half, defleshed, stained with 1% aqueous methylene blue[#] placed on microscope slides and photographed using a digital camera^{††}. Resorption area was measured including the occlusal tip of the vestibular side of the teeth to the bone border in the entire maxilla. The images were evaluated using Image J software^{‡‡}.^{11,12,13}

Radiographic density (RD) of hemimaxillae

The same specimens used for morphometric analysis were radiographed using Digora Soredex System^{®§§}. The hemimaxillae were posed over the sensor. Radiographic images were acquired using 63 kVp, 8 mA, 0.06 s of time exposure and 30 cm focal distance. These images were evaluated by Image J software^{‡‡}. A region of interest (ROI) of 128 pixels was selected and posed under the cement-enamel junction from mesial to distal, of second molar in the diseased side as well as on its contra lateral normal side. Gray tone differences from both areas were considered as a value of radiographic density. The radiographic density analysis was done by the histogram tool of Image J software^{‡‡}, which uses a 256 grey tone scale, where zero indicates the black and 255 the white color.¹¹

Radiographic Density (RD) of Femur

The right femurs of animals were removed on day 11 after ligature placement and fixed, for 24 h, in 10% formaldehyde^{**}. The radiographic density was performed using Digora Soredex System^{®§§}. The femurs were posed over the sensor. Radiographic images were acquired using the same configuration as for the maxilla. These images were evaluated by Image J software^{‡‡}. A region of interest (ROI) was created measuring 0,5 (w) 0,5 (y), in the form of a square, with 473 x 229 pixels, and was positioned in the proximal femur diaphysis, and the same evaluator drew all ROIs panel. A

standardized method was used to analyze the ROI of each image. Grey tone differences from both areas were considered as a value of radiographic density. The radiographic density analysis was done similarly to the ones of maxilla.^{10,14}

Gingival levels of TNF- α and IL-1 β

Tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -1 β concentrations were determined in the buccal gingiva surrounding the maxillary left molars by the time of euthanasia in all experimental groups. The gingival tissue was removed and stored at -80 °C. The material was homogenized in a solution of RIPA Lysis Buffer System^{||}. The cytokines were quantified by the following kits: TNF- α –Rat TNF-alpha/TNFSF1A Quantikine ELISA Kit^{##}; IL-1 β –Rat IL-1 beta/ IL-1F2 Quantikine ELISA Kit^{¶¶}. All procedures followed the instructions of the manufacturer R&D Systems. The absorbance was measured at 450 nm. IL-1 β and TNF- α concentrations were expressed as pg/mL.¹⁵

Leukogram

The method for analysis of total white blood cell, neutrophil and mononuclear cell counts was as follows: 20 μ L of blood was taken from the rat tail and added to 380 μ L of Turk solution. Total white blood cell counts were performed using a Neubauer chamber, and the differential counts were made using smears stained by a rapid Instant Prov Stain Set^{##}. White blood cell counts of the groups of rats from all experimental groups in the beginning and at the end of the assay.^{12,13}

Serum levels of transaminases and total alkaline phosphatase

Blood samples were collected from the orbital plexus after local anesthesia in rats from all groups in the beginning and at the end of the assay. Serum levels of Total alkaline phosphatase (TALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were calculated. These analyses were performed following the manufacturer instruction^{***}.^{12,13}

Serum levels of Bone-Specific Alkaline Phosphatase

Blood samples were collected from the orbital plexus of anesthetized rats from all groups in the beginning and at the end of the assay. Bone-specific alkaline phosphatase (BALP),

a thermosensible isoform of total alkaline phosphatase, was evaluated using a thermoactivation method. The samples were heated to 56°C for 10 min.¹⁶ Serum levels of BALP were calculated by subtracting the concentration of heated alkaline phosphatase in serum from the concentration of total alkaline phosphatase (TALP) in serum. These analyses were performed according to the manufacturer instruction^{*** 12,13}.

Statistical Analysis

The data obtained in the analyses were grouped and presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M). ANOVA followed by the Bonferroni or T-Student test were used to compare the means. A p value of $p < 0.05$ was considered to indicate significant differences. All calculations were performed using the GraphPad Prism 5 software^{†††}. All protocols and analyses were performed in a blinded manner.

RESULTS

All animals tolerated the experimental procedures well and remained healthy throughout the experimental period. No significant differences regarding body weight variation were observed among groups ($p > 0.05$). (Not shown data)

Examiner Calibration

There were no significant differences between the measurements performed by the same examiner in all analyses when the first and the second evaluations were compared ($p > 0.05$). There was also a significant correlation between the measurements obtained by the two examiners ($r > 0.90$).

Effect of ATV on bone structure

On macroscopic analysis, the animals subjected to PD showed important bone resorption ($5.24 \pm 0.39 \text{ mm}^2$), marked by furcation lesion and root exposure (Figure 3D). GIOP did not cause bone loss ($0.61 \pm 0.12 \text{ mm}^2$) (Figure 3G) when compared to PD group ($p > 0.05$) (Figure 3A). However the animals subjected to GIOP+PD showed a greater bone resorption ($7.53 \pm 0.75 \text{ mm}^2$) (Fig. 3J) when compared to PD or GIOP ($p < 0.05$). The treatment with Atorvastatin (ATV) reduced alveolar bone loss ($4.68 \pm 0.39 \text{ mm}^2$) (Figure 3M) when compared to GIOP+PD ($p < 0.05$) (Figure 2A).

Considering the radiographic density (RD) of hemimaxillae, the animals subject to periodontitis showed significant reduction on RD (PD=160.17±4.67 grey tones)(Figure 3E) when compared normal hemimaxillae (196.85±2.61) (Figure 3B). GIOP did not change significantly, RD of hemimaxillae (181.17±3.57) (Figure 3H) when compared to the Normal ones. On the other hand, the hemimaxillae of animals subjected to GIOP+DP showed lowerRD (138.41±5.05) (Figure 3K) when compared to Normal, PD or GIOP groups ($p < 0.05$). The treatment with ATV prevented RD reduction (166.42±1.93) (Figure 3N) when compared to GIOP+PD group (Figure 2B).

Evaluating the RD of femurs of animals, the ones subjected to PD (164.27±5.10 grey tones) (Figure 3F) did not show significant difference when compared to bone of Normal group (163.10±2.82) (Figure 3C). GIOP cause a significant reduction on RD on femur (133.77±1.43) (Figure 3I) when compared to Normal or PD groups. The animals subjected to GIOP+DP showed reduced RD of femur (134.15±1.48) (Figure 3L) when compared to Normal and PD groups ($p < 0.05$). ATV prevented the reduction of RD of femur (157.20±5.06) (Figure 3O) when compared to GIOP+DP group ($p < 0.05$) (Figure 2C).

Effect of ATV on gingival TNF- α and IL-1 β levels

The induction of PD caused a significant increase in gingival TNF- α and IL-1 β levels when compared to Normal tissue. GIOP did not alter the gingival levels of these two pro-inflammatory cytokines. The gingival tissue of animals subjected to GIOP+PD showed increase on TNF- α and IL-1 β levels when compared to normal tissue ($p < 0.05$). However the treatment with ATV prevented the increase of TNF- α and IL-1 β levels when compared to tissue of animals from groups PD or GIOP+PD ($p < 0.05$). (Table 1)

Effect of ATV on Leukogram

Regarding total leukocyte counts, it was observed that PD caused leukocytosis after ligature (17.50±0.95 leukocytes x 10³/mm³) (Figure 4A), when compared to Baseline data (7.27±0.39). This leukocytosis was marked ($p < 0.05$) by neutrophilia (5.85±0.28 neutrophil x 10³/mm³), when compared to Baseline (2.70±0.28) (Figure 4B). It was observed a leukocytosis on group GIOP (14.17±0.92) as well as in GIOP+PD group (15.89±1.78) (Figure 4A) also marked by neutrophilia (GIOP=5.41±0.36 and

GIOP+DP=6.33±0.46) (Figure 4B). The treatment with ATV reduced ($p<0.05$) leukocytosis (8.57±0.75) (Figure 4A) and neutrophilia (3.10±0.53) (Figure 4B) when compared to all groups, showing no difference from Baseline. No alteration was seen on mononuclear cell count in any experimental group (Figure 4C).

Serum dosage of Transaminase and Total Alkaline Phosphatase (TALP)

For AST and ALT there was no statistical difference in the any experimental group when compared to Baseline. However, a significant decrease in TALP serum levels was observed in the animals from PD and in GIOP groups, when compared to Baseline data. The animals from group GIOP+PD showed an even greater reduction of TALP serum levels when compared to Baseline ($p<0.05$). The treatment with ATV showed a significant increase on TALP serum levels when compared to GIOP+PD group (Table 2).

Bone-specific Alkaline Phosphatase (BALP)

Periodontal disease and GIOP caused a significant decrease in BALP serum levels when compared to baseline data. The animals from group GIOP+PD showed greater reduction of BALP serum levels when compared to baseline and PD group ($p<0.05$). The treatment with ATV showed a significant increase on BALP serum levels when compared to GIOP or GIOP+PD groups (Table 2).

DISCUSSION

In this study, we intended to evaluate the effect of ATV in animals subjected to GIOP and PD, and from the best of our knowledge, this is the first time that this effect was demonstrated. Periodontitis is an important inflammatory disease that causes alveolar bone resorption.^{11,12,13} Inflammatory periodontal diseases also exhibit an association with multiple systemic conditions such as diabetes, cardiovascular disease, respiratory diseases, rheumatoid arthritis, certain cancers, erectile dysfunction, kidney disease, dementia and specially osteoporosis.¹⁷

Osteoporosis is characterized by low bone mineral density (BMD) and loss of the structural and biomechanical properties that are required to maintain bone homeostasis. It can be associated with aging, postmenopausal status, and have

secondary causes, including chronic illnesses, lifestyle issues or medications. Glucocorticoids (GCs) are most commonly associated with drug-induced osteoporosis.¹⁸The GIOP model adopted in this study caused important bone loss as seen on radiographic density analysis of femurs. In this way considering that the goal for osteoporosis therapy is the inhibiting bone resorption and/or stimulating bone formation several pharmacological agents have been pointed out and Atorvastatin (ATV), is one of them.¹⁹ATV has been widely used in order to treat the dyslipidemias, but it has also showed pleiotropic effects including anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant properties, as well as angiogenesis promotion and increase of osteoblastic differentiation, inducing bone formation²⁰which might be interesting for osteoporosis treatment.

It was observed that GIOP+PD caused intense alveolar bone loss, evaluated by macroscopic and radiographic analysis, inflammation, as observed by increase on TNF- α and IL-1 β gingival levels and on leukocytosis marked by neutrophilia, as well as alteration on bone metabolism due to reduction of TALP and BALP. The treatment with ATV reversed all findings of bone resorption and inflammation observed.

It has been reported that GCs have both direct and indirect effects affecting bone metabolism. GIOP occurs in two phases, a rapid phase of bone loss mediated through osteoclastic bone resorption and a later phase of bone loss caused by decreased bone formation.²¹ Considering the osteoclast bone resorption, GCs have been reported to increase the expression of RANKL and decrease OPG expression in osteoblasts and stromal cells.²² GCs also increase the expression of interleukin-6, which stimulates osteoclastogenesis,²³ and it can also decrease the apoptosis of osteoclasts.²⁴ These changes result in an initial increase in the number of osteoclasts capable of resorbing bone. PD can even amplify bone loss increasing the production of reactive oxygen species (ROS) which upregulate RANKL expression²⁵ leading to osteoclastogenesis and intense bone resorption.²⁶ Therefore these findings can explain the greater bone loss on GIOP+PD group. On the other hand, the treatment with ATV significantly lowered bone loss. The antiresorptive effect of ATV may be related to its antioxidative's effect. It has been reported that ATV can increase GSH and SOD levels, as well as reduction of lipid peroxidation and malondialdehyde,²⁷ which converge to reduction of ROS.²⁸ ATV can also reduce serum IL-6 levels,²⁹ downregulate RANKL and increase OPG levels.²⁷

The bone metabolism it was also evaluated by the serum levels of TALP and BALP. TALP, as an enzyme associated with the plasma membrane of cells, such as osteoblasts. Beyond bone tissue, alkaline phosphatase is also found in the liver, intestine and placenta.³⁰ BALP represents <40 % of serum TALP, it is produced only by activated osteoblast and has stood out as an excellent and specific indicator of global bone formation activity.³¹ In this study GIOP+PD caused a decrease on BALP serum levels. GCs are known to decrease bone formation, by decreasing the formation of osteoblasts and by increasing osteoblast apoptosis.³² GCs can also shift the differentiation of pluripotent stromal cells away from osteoblasts toward the adipocyte lineage by induction of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ).³³ GCs also suppress canonical Wnt/ β -catenin signaling, a key regulator of osteoblastogenesis.³⁴ The bone morphogenetic protein (BMP) pathway, involved in stimulating osteoblast differentiation and bone formation, is also suppressed by GCs. Reduction of BALP serum levels in PD has been already reported.^{12,13} However, ATV prevented the reduction on these serum bone markers. Mundy et al,³⁵ showed that statins possess anabolic action due to enhanced BMP-2 expression. One hypothesis for this anabolic effect is that, by inhibiting the mevalonate pathway and preventing the prenylation and function of small GTPase, BMP-2 expression may be stimulated, causing increased osteoblast expression and differentiation and subsequent enhancement of bone formation.³⁶ Statins can also inhibit adipogenesis and enhance osteoblast differentiation by inducing BMP-2 expression.³⁷ WNT canonical pathway might be another interesting way to explain the anabolic effect of ATV on bone tissue, since it has been related that ATV decreased DKK1 levels, an antagonist of WNT/ β -catenin signaling.^{38,39}

Considering the inflammatory process, the animals subjected to GIOP+PD showed a significant neutrophilia. GCs have been reported to increase the expression of GM-CSF, ICAM-1, VCAM, P selectin²² which influences on the raise of leukocyte on peripheral blood.⁴⁰ PD can contribute to inflammation, also causing neutrophilia.^{12,13} Neutrophils have been considered the first line of defense against infectious agents. Neutrophils can destroy periodontal pathogens by both oxygen-dependent (the “respiratory or oxidative burst and oxygen-independent (lytic and proteolytic enzymes) mechanisms.⁴¹ The respiratory burst is an important pathway for microbial killing and involves the generation of ROS inside phagosome. However, they may be released into the extracellular microenvironment increasing the oxidative

stress, that in close proximity to alveolar bone can activate forkhead box O3 and Wnt signaling pathways, triggering RANKL-mediated bone resorption.⁴² In this study ATV reversed neutrophilia, as in accordance to previous study,⁴³ due to ICAM-1, VCAM, P-selectin inhibition.

GIOP+PD also increased gingival TNF- α and IL-1 β levels. GCs have been reported to inhibit gonadotropin secretion, leading to hypogonadism, which in turn enhances secretion of cytokines such as IL-6, TNF- α .⁴⁴ High levels of TNF- α and IL-1 β are frequently seen in periodontal sites.⁴⁵ During periodontal inflammation neutrophils, among other cells, produce large amount of TNF- α and IL-1 β that can stimulate bone resorption.⁴⁶ ATV, in turn, reduced gingival TNF- α and IL-1 β levels, as seen previously.²⁷ This anti-inflammatory effect may contribute to the bone protection.

Transaminases (AST and ALT) are considered markers of liver injury. It has been reported that serum liver enzymes may increase during statin therapy specially the hydrophilic ones,⁴⁷ nevertheless ATV is a lipophilic statin, which in fact was confirmed by our findings since no significant change was seen on AST and ALT serum levels. However, on this study ATV was administered for a short period of time (11 days), while most treatment regimens, in humans, described in literature used ATV for longer periods.⁴⁸ Clinical trials may consider frequent evaluation of liver function.

CONCLUSIONS

In summary, considering our findings, we can suggest that ATV can be potential agent for preventing bone resorption in periodontitis associated with glucocorticoid-induced osteoporosis. Even though the used dose of ATV is not equivalent to the one recommended to control cholesterol levels in humans, this study can be important on providing information on the anti-resorptive, anabolic bone and anti-inflammatory effect of ATV which may be an interesting pharmacological tool to the treatment of periodontitis associated to glucocorticoid-induced osteoporosis.

SOURCE OF SUPPORT

National Council for Research and Technological Development (CNPq – Brasília, DF, Brazil; Process (480481/2013-0) and the Foundation for Support in Scientific and Technological Development of Ceará (FUNCAP- Fortaleza, CE, Brazil; Process PJP-

0072-00092.01.00/12).

There is no relationship between any author and commercial firms that may pose a conflict of interest.

FOOTNOTES

[¶]Decadron[®], Aché - Guarulhos – SP, Brazil

Lipitor[®], Pfizer- São Paulo - SP, Brazil

** Reagen Produtos para Laboratórios Ltda[®], Rio de Janeiro-RJ, Brazil

^{††} Nikon[®], D40; Melville-NY, USA

^{‡‡} Software ImageJ1.32j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

^{§§} Dental Imaging Company Ltd, Portslade-East Sussex, UK

^{||} Santa Cruz Biotechnology, Dallas-TX, USA

^{¶¶} R&D Systems, catalog number RTA00, Minneapolis-MN, USA

^{##} Newprov Products for Laboratory[®], Pinhais-PR, Brazil

^{***} Labtest[®], Lagoa Santa-MG, Brazil

^{†††} Graph Pad, Inc., San Diego-CA, USA

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the National Council for Research and Technological Development (CNPq – Brasília, DF, Brazil; Process (480481/2013-0) and the Foundation for Support in Scientific and Technological Development of Ceará (FUNCAP- Fortaleza, CE, Brazil; Process PJP-0072-00092.01.00/12) for supporting the study

All authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Disease. *The lancet* 2005;366:1809-1820.
2. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Review Article- Periodontal

Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:503754

3. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Costa N, Oliveira JL, Barros M. The Landscape of Protein Biomarkers Proposed for Periodontal Disease: Markers with Functional Meaning. *Biomed Res Int* 2014;2014:569-632.
4. Grossman JM, Gordon R, Ranganath VK, et al. Recommendations for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid- Induced Osteoporosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62:1515-1526.
5. De Nijs RN. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options. *Minerva Med* 2008;99:23-43.
6. Zhou DA, Zheng HX, Wang CW, Shi D, Li JJ. Influence of glucocorticoids on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *BMC MusculoskeletDisord* 2014;15:239.
7. Bone HG, Kiel DP, Lindsay RS, et al. Effects of Atorvastatin on bone in Postmenopausal Women with Dyslipidemia: a Double- Blind, Placebo Controlled, Dose-Ranging Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4671-4677.
8. Kronmman L, Hatfield C, Kronmann K. Statins therapy: Not just used to lower cholesterol? *Crit Care Nurs* 2007;30:154-160.
9. Mason RP. Molecular basis of differences among statins and a comparison with antioxidant vitamins. *Am J Cardiol* 2006;98:34-41.
10. Lucinda LM, Aarestrup BJ, Peters VM, Reis JE, Oliveira RS, Guerra Mde O. The effect of the Ginkgo biloba extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Phytother Res* 2013;27:515-520.
11. Goes P, Lima APS, Melo IM, Rego RO, Lima V. Effect of atorvastatin on ligature-induced periodontitis in Wistar rats: radiographic and macroscopic analysis. *Braz Dent J* 2010;21:193–198.
12. Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima APS, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol* 2012;57:1537-1544.
13. Goes P, Melo IM, Silva LMCM, et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature- induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2014;49:45-54.
14. Mahl CRW, Tonietto A, Giorgi BG, Girotto CV, Fontanella VRC. Evaluation of radiographic density and proportion of trabecular bone in the femur of female rats medicated with glucocorticoid and bisphosphonate. *Rev. Odontocienc* 2009;24:28-31.

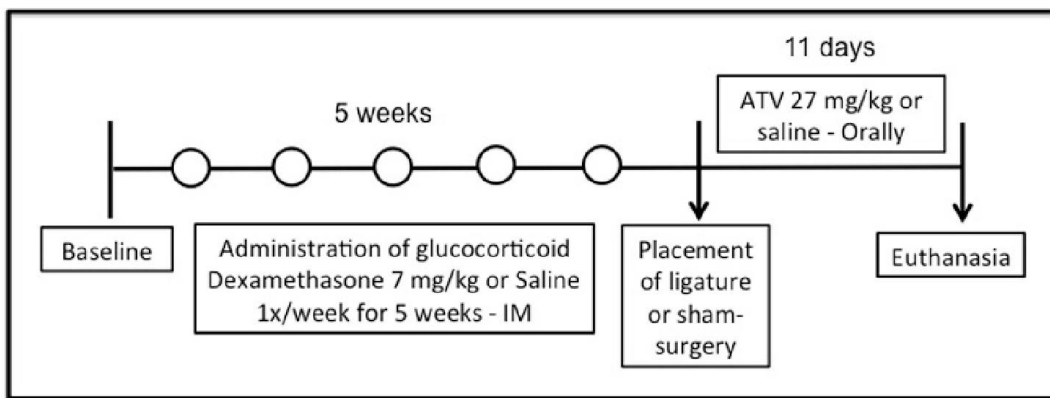
15. DaConceiçãoRivanor RL, Chaves HV, do Val DR, et al. A lectin from the green seaweed *Caulerpacupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. *IntImmunopharmacol* 2014;21:34-43.
16. Moss DW, Whitby LG. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1975;61:63–71.
17. Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract* 2012;12(3 Suppl):20-28.
18. Panday K, Gona A, Humphrey MB. Medication-induced osteoporosis: screening and treatment strategies. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2014;6(5):185-202.
19. Montagnani A. Bone anabolics in osteoporosis: Actuality and perspectives. *World J Orthop* 2014;5(3):247-254.
20. Von Scheven E, Corbin KJ, Stefano S, Cimaz R. Glucocorticoid-associated osteoporosis in chronic inflammatory diseases: epidemiology, mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Osteoporos Rep* 2014;12:289-299.
21. Maricic M. Update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2011;37:415-531.
22. Sivagurunathan S, Muir MM, Brennan TC, Seale JP, Mason RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J Bone Miner Res* 2005;20:390-398.
23. Dovio A, Perazzolo L, Saba L, et al. High-dose glucocorticoids increase serum levels of soluble IL-6 receptor alpha and its ratio to soluble gp130: an additional mechanism for early increased bone resorption. *Eur J Endocrinol* 2006;154:745-751.
24. Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology* 2006;147:5592-5599.
25. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990;85:632–639.
26. Lee NK, Choi YG, Baik JY et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005;106:852–859.
27. De Araújo Júnior RF, Souza TO, de Moura LM, et al. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. *PLoS One* 2013;8:e75322.

28. Kumar VL, Guruprasad B, Wahane VD. Atorvastatin exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in adjuvant-induced monoarthritis. *Inflammopharmacology* 2010;18:303-308.
29. Chang B, Yang J, Li H, Lu S, Chen L, Fang P. Effects of atorvastatin on bone metabolism and bone mineral density in Wistar rats. *Pharmazie* 2011;66:535-537.
30. Moss DW. Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. *Clin. Biochem* 1987;20:225–230.
31. Kamiya N, Suzuki H, Endo T, et al. Clinical usefulness of bone markers in prostate cancer with bone metastasis. *Int J Urol* 2012;19:968-979.
32. Chen F, Zhang L, OuYang Y, Guan H, Liu Q, Ni B. Glucocorticoid induced osteoblast apoptosis by increasing E4BP4 expression via up-regulation of Bim. *Calcif Tissue Int* 2014;94:640-647.
33. Li J, Zhang N, Huang X, Xu J, Fernandes JC, Dai K, Zhang X. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis* 2013 Oct 3;4:e832.
34. Guañabens N, Gifre L, Peris P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2014;12:90-97.
35. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
36. Garrett IR, Esparza J, Chen D, et al. Statins mediate their effects on osteoblasts by inhibition of HMG-CoA reductase and ultimately BMP-2. *J. Bone Miner Res* 2000;15:S225.
37. Song C, Guo Z, Ma Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:458-462.
38. Pérez Castrillón JL, San Miguel A, Vega G, et al. Levels of DKK1 in patients with acute myocardial infarction and response to atorvastatin. *Int J Cardiol* 2010;145:164-165.
39. Rachner TD, Göbel A, Thiele S, et al. Dickkopf-1 is regulated by the mevalonate pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;16(1):R20.
40. Khajah M, Millen B, Cara DC, Waterhouse C, McCafferty DM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. *J Leukoc Biol* 2011;89:945-953.
41. Scott DA, Krauss J. Neutrophils in periodontal inflammation. *Front Oral Biol* 2012;15:56-83.

42. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: new players in the periodontitis arena? *J Periodontol Res* 2011;46:397-406.
43. Ajamieh H, Farrell G, Wong HJ, et al. Atorvastatin protects obese mice against hepatic ischemia-reperfusion injury by Toll-like receptor-4 suppression and endothelial nitric oxide synthase activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1353-1361.
44. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006;116:1186–1194.
45. Gonçalves DC, Evangelista RC, da Silva RR, et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. *ExpBiol Med(Maywood)*2014;239:442-453.
46. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
47. Dale KM, White CM, Henyan NN, Kluger J, Coleman CI. Impact of statin dosing intensity on transaminase and creatine kinase. *Am. J. Med* 2007;120:706-712.
48. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Mora S, et al. Impact of high-dose atorvastatin therapy and clinical risk factors on incident aortic valve stenosis in patients with cardiovascular disease (from TNT, IDEAL, and SPARCL). *Am J Cardiol*2014;113:1378-1382.

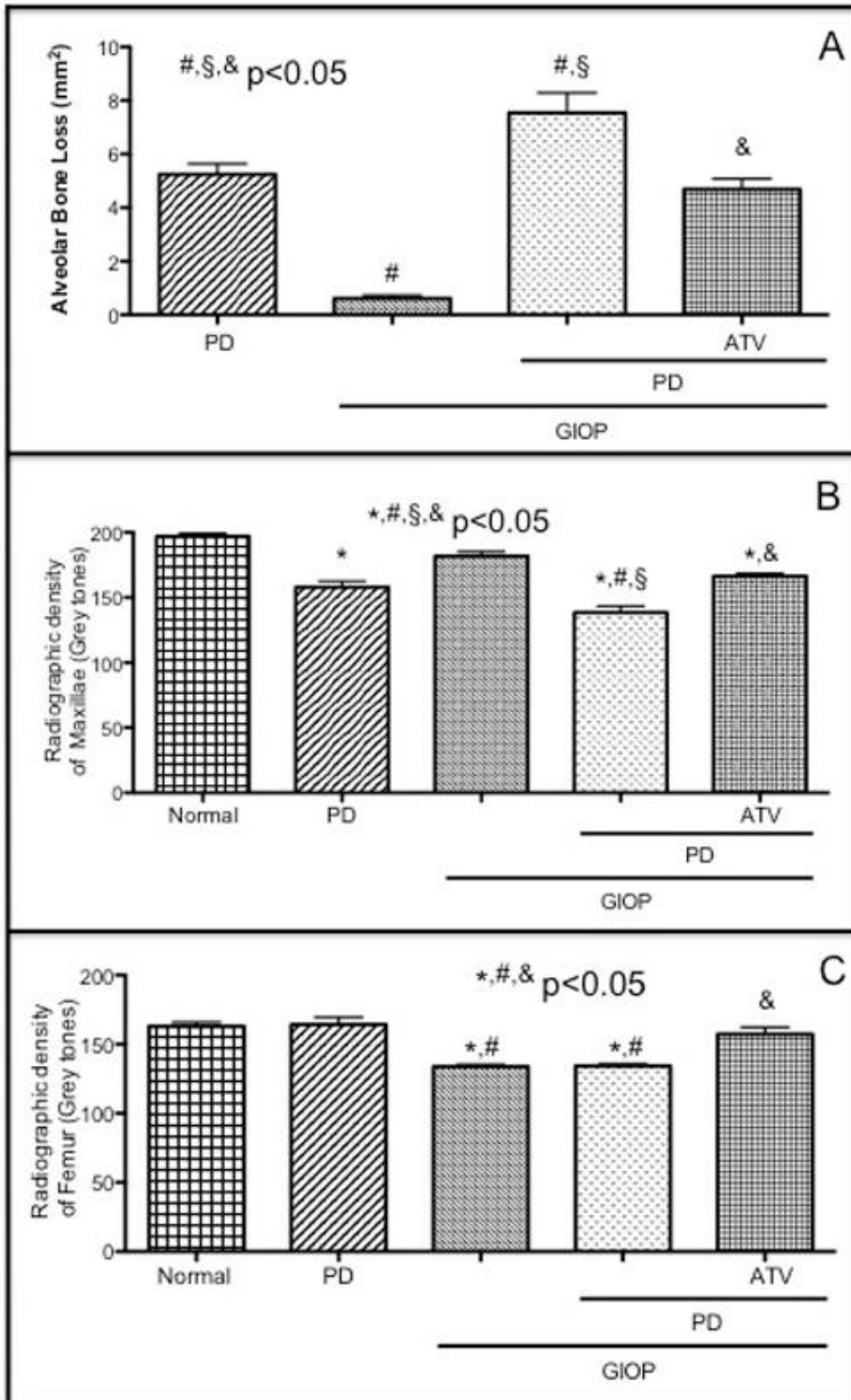
FIGURE LEGENDS

Figure 1.



Timeline of Events

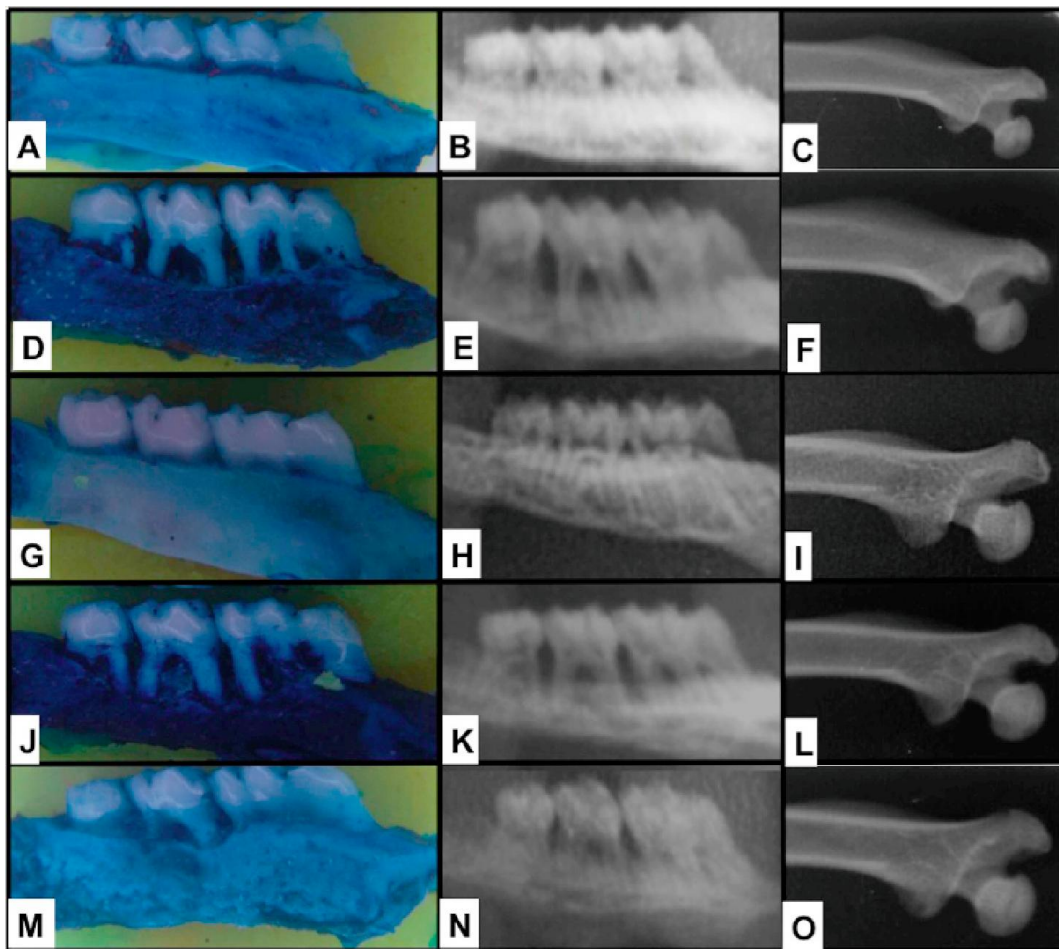
Figure 2.



A) Effect of ATV in ABL in rats with PD, GIOP and GIOP+PD. Bars represent the mean±SEM of 6 animals per group. **B)** Effect of ATV on radiographic density of maxilla of rats with PD, GIOP and GIOP+PD. Bars represent the mean±SEM of 6

animals per group. C) Effect of ATV on radiographic density of femur of in rats with PD, GIOP and GIOP+PD. Bars represent the mean \pm SEM of 6 animals per group. *Significant difference ($p<0.05$) compared to Normal. #Significant difference ($p<0.05$) compared to PDgroup. §Significant difference ($p<0.05$) compared to GIOPgroup. &Significant difference ($p<0.05$) compared to GIOP+PDgroup. (ANOVA followed by Bonferroni Test).

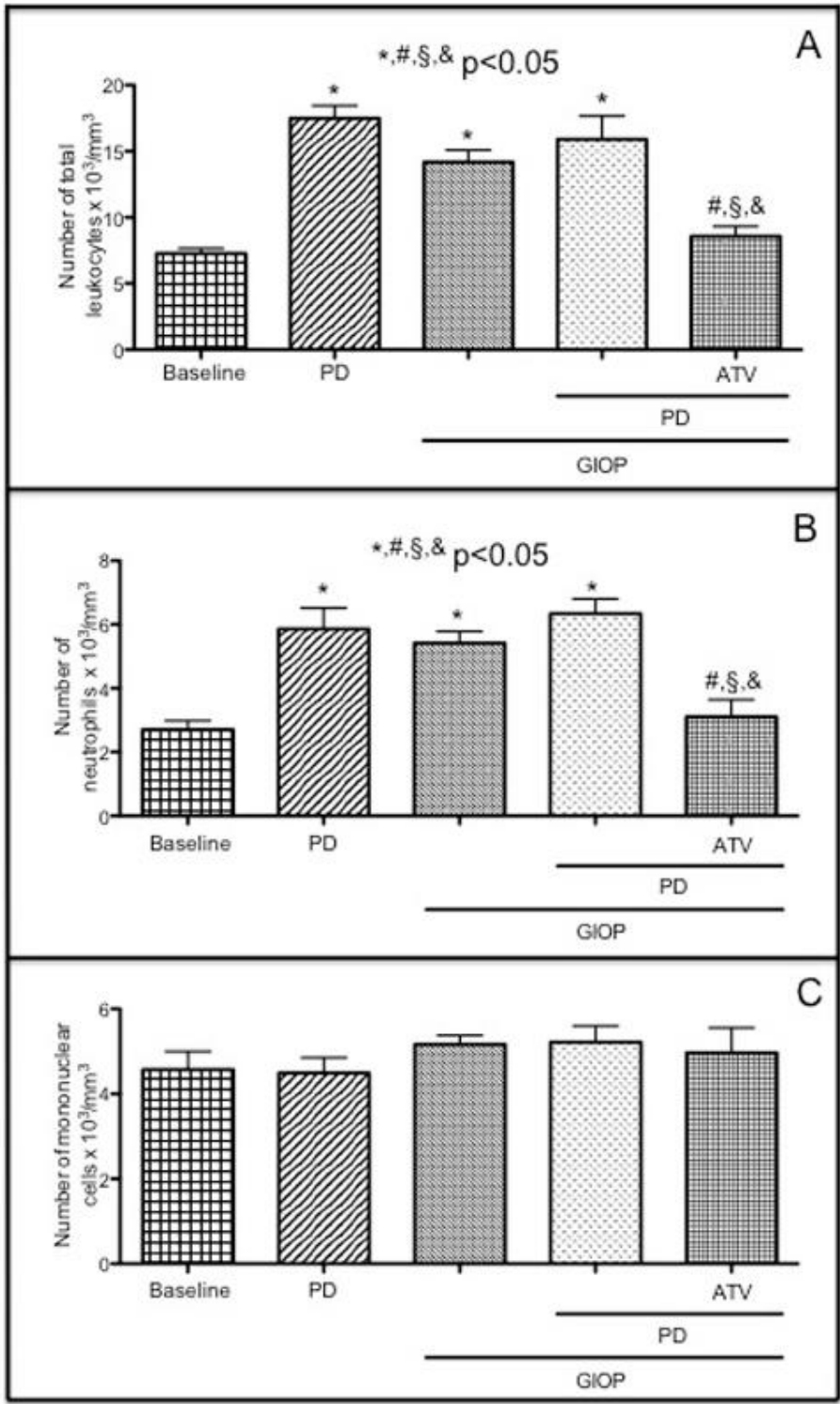
Figure 3.



Macroscopic and radiographic images of hemimaxillae and femur of animals. A, B and C) shows hemimaxillae and femur of animals from group Normal. D, E and F) shows hemimaxillae and femur from animals from PDgroup. G, H and I) shows hemimaxillae

and femur from animals from GIOPgroup. **J, K and L)** shows hemimaxillae and femur from animals from GIOP+PDgroup. **M, N and O)** shows hemimaxillae and femur from animals from ATVgroup.

Figure 4.



Effect of ATV on leukogram in rats with PD, GIOP and GIOP+PD. Bars represent mean \pm SEM of total leukocytes (A), neutrophils (B) and mononuclear cells (C) $\times 10^3/\text{mm}^3$ of six rats per group. *Significant difference ($p < 0.05$) compared to Baseline.

[#]Significant difference (p<0.05) compared to PDgroup. [§]Significant difference (p<0.05) compared to GIOPgroup. [&]Significant difference (p<0.05) compared to GIOP+PDgroup. (ANOVA followed by Bonferroni Test; T-Student Test).

TABLES

Table 1.Effect of ATV on Gingival levels of TNF- α and IL-1 β of rats subjected to PD, GIOP orGIOP+PD.

| | Groups | | | | |
|-----------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | Normal | PD | GIOP | GIOP+PD | ATV |
| TNF- α (pg/ml) | 2.77 \pm 0.17 | 4.77 \pm 0.25 [*] | 3.27 \pm 0.35 | 4.61 \pm 0.53 [*] | 2.53 \pm 0.09 ^{#,&} |
| IL-1 β (pg/ml) | 4.50 \pm 0.17 | 6.26 \pm 0.43 [*] | 4.07 \pm 0.38 | 6.33 \pm 0.31 ^{*,§} | 3.96 \pm 0.24 ^{#,&} |

Data are reported as mean \pm SEM of 6 animals per group

^{*}Significant difference (p<0.05) compared to Normal.

[#]Significant difference (p<0.05) compared to PDgroup.

[§]Significant difference (p<0.05) compared to GIOPgroup.

[&]Significant difference (p<0.05) compared to GIOP+PDgroup.

(ANOVA followed by Bonferroni Test).

Table 2.Effect of ATV on serum levels of Transaminases (AST/ALT) Total alkaline phosphatase (TALP) and bone-specific alkaline phosphatase (BALP)of rats subjected to PD, GIOP or GIOP+PD.

| | Groups | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------------------------|
| | Baseline | PD | GIOP | GIOP+PD | ATV |
| AST (U/L) | 44.57±1.59 | 44.07±1.68 | 40.84±1.59 | 42.70±2.73 | 42.11±2.81 |
| ALT (U/L) | 24.29±1.78 | 23.70±2.56 | 23.49±1,75 | 21.15±2.47 | 21.36±3.16 |
| TALP (U/L) | 76.47±3.26 | 56.88±2.70* | 49.68±5.72* | 29.10±3.55* | 57.55±2.98*,& |
| BALP (U/L) | 29.52±0.93 | 21.64±0.78* | 17.39±0.81* | 13.25±0.66* [#] | 25.56±1.73 ^{§,&} |

Data are reported as mean±SEM of 6 animals per group

*Significant difference (p<0.05) compared to Baseline.

[#]Significant difference (p<0.05) compared to PDgroup.

[§]Significant difference (p<0.05) compared to GIOPgroup.

[&]Significant difference (p<0.05) compared to GIOP+PDgroup.

(ANOVA followed by Bonferroni Test; T-Student Test).

5. DISCUSSÃO GERAL

A doença periodontal corresponde à segunda maior patologia bucal que mais afeta a população humana no mundo (PETERSEN & OGAWA, 2005). Por esta razão, um melhor entendimento sobre sua etiologia, patogênese, diagnóstico e tratamento faz-se necessário à mudança deste quadro epidemiológico, especialmente porque estudos recentes vêm demonstrando uma mudança interessante de paradigma dentro da periodontologia (PRESHAW *et al.*, 2004). Durante muito tempo, o biofilme bacteriano foi entendido como o fator etiológico primário para a destruição periodontal. Entretanto, quando de forma isolada, a presença deste agente tem se mostrado insuficiente para explicar a progressão e severidade da periodontite (SALVI & LANG, 2005). Assim, o papel do hospedeiro na etiologia das doenças periodontais ganha destaque, pois o maior componente responsável pela destruição tecidual periodontal resulta da ativação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro, como consequência ao desafio microbiano (MADIANOS *et al.*, 2005).

De fato, bactérias periodontopatogênicas estimulam células que induzem os tecidos periodontais a expressar vários mediadores inflamatórios tais como interleucinas (IL)-6 (RADVAR *et al.*, 2008) e IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) (ASSUMA *et al.*, 1998), óxido nítrico (NO) (DI PAOLA *et al.*, 2004), ou o ligante de receptor ativador do fator nuclear (RANKL). Subseqüentemente, estes mediadores podem ativar a produção de metaloproteinases de matriz (ACHONG *et al.*, 2003) e prostaglandinas (ALPAGOT *et al.*, 2007), além de induzir o recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos, linfócitos (SALVI & LANG, 2005), e a diferenciação de osteoclastos, resultando em destruição irreversível de tecido conjuntivo e reabsorção óssea alveolar (HONDA *et al.*, 2006). Várias são as maneiras de se estudar a periodontite. Porém, o longo curso da doença e os princípios éticos envolvidos fazem dos modelos animais meios interessantes para o entendimento da patogênese e a determinação de novas estratégias terapêuticas para essa doença (WEINBERG & BRAL, 1999). Manipulação da dieta (ROBINSON *et al.*, 1991), o uso de ligadura em molares (SALLAY *et al.*, 1982) ou inoculação de bactérias periodontopatogênicas (JORDAN *et al.*, 1972; FIEHN *et al.*, 1992) estão entre os principais modelos utilizados que, por sua vez, têm sido realizados em macacos, ratos, cachorros e hamsters. O modelo de periodontite induzido por ligadura em ratos tem se sobressaído principalmente pela facilidade na técnica de indução da doença, acessibilidade e custos reduzidos para sua realização. Contudo, a mais importante vantagem deste modelo baseia-se na grande similaridade dos tecidos periodontais entre humanos e ratos (WEINBERG & BRAL, 1999).

Atualmente temos utilizado o modelo de periodontite desenvolvido por LIMA *et al.* (2000; 2004), acrescido de algumas modificações, tais como modificação no método de obtenção da área de reabsorção. Nesse estudo, a periodontite, induzida pela colocação de um fio de náilon (000), em torno dos segundos molares superiores esquerdos dos ratos, causou intensa destruição óssea alveolar, ao final dos 11 dias, avaliada através de estudo macroscópico. Tais achados foram confirmados pela análise histopatológica, onde se observou que 11 dias de ligadura causou reabsorção

completa do processo alveolar, intenso infiltrado inflamatório e dano no cemento radicular. Ainda corroborando com os achados prévios desse estudo, a análise radiográfica mostrou uma redução significativa da densidade radiográfica na região da ligadura.

Estes resultados estão de acordo com aqueles publicados por outros autores, os quais demonstram que, através de estudo morfométrico, ratos submetidos à periodontite de forma semelhante apresentaram reabsorção óssea alveolar significativa (LIMA *et al.*, 2000, 2004; CAVAGNI *et al.*, 2005; NAPIMOGA *et al.*, 2008). À análise histológica, também foi visto que a periodontite induz intensa reabsorção óssea, com presença marcante de infiltrado inflamatório (JIN *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2008), e, no estudo radiográfico, tal dano ósseo decorrente da indução da periodontite foi caracterizado pela perda de densidade radiográfica (CÉSAR-NETO *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 2008).

A homeostase óssea relaciona-se estreitamente com o processo inflamatório. Linfócitos e macrófagos, mantidos pela inflamação, produzem citocinas, tais como TNF e IL-1, dentre outras, que recrutam e ativam células inflamatórias adicionais (XING *et al.*, 2005). A superexpressão destes mediadores, por sua vez, acaba por desempenhar papel importante na patogênese da periodontite, ativando o sistema RANK/RANKL e inibindo OPG, o que promove intensa osteoclastogênese e reabsorção óssea (XING *et al.*, 2005). Além desses, muitos outros fatores ativadores de osteoclastos têm sido identificados como participantes do processo de reabsorção, tais como: fator transformador de crescimento (TGF)- β , fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), metaloproteínas de matriz (MMPs) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α (TAKAYANAGI, 2005).

Com relação aos achados hematológicos, nossos resultados mostraram que a periodontite alterou a contagem total e diferencial dos leucócitos no sangue periférico dos animais. A leucocitose observada foi marcada por neutrofilia, na 6ª hora e posteriormente por linfomonocitose nos 7º e 11º dias. Essas observações estão de acordo com alguns autores que já demonstraram ocorrer leucocitose na presença de periodontite induzida em ratos (SAMEJIMA *et al.*, 1990; LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2000). Quanto à variação de massa corpórea, verificou-se que os animais submetidos à periodontite apresentaram perda de massa corpórea nos dois primeiros dias após colocação da ligadura, provavelmente devido ao trauma durante a instalação do fio, pois o estabelecimento e progressão da perda óssea alveolar em ratos não sofre influência da massa corpórea (SIMCH *et al.*, 2008). Posteriormente, apesar do ganho de massa corpórea, estes ratos não conseguiram acompanhar a curva de perda de peso de animais normais, corroborando achados de outros estudos (LIMA *et al.*, 2000; 2004).

Uma vez verificados os efeitos locais da ligadura dos molares dos animais, seguiram-se as avaliações no intuito de se verificar possíveis repercussões sistêmicas. Assim, os animais submetidos à periodontite foram também avaliados quanto a possíveis alterações hepáticas e renais. Neste

estudo observou-se que esta doença não induz lesões nesses órgãos, uma vez que as respectivas enzimas séricas apresentaram poucas variações entre os dias 0 e 11. Tais achados foram corroborados pelas análises histológicas realizadas. Contudo, apesar da proteção observada, os níveis de fosfatase alcalina total (FAT), considerados um forte indicador de doenças hepáticas, mostraram variações importantes, provavelmente porque alterações de suas concentrações plasmáticas podem refletir outros problemas de origens diversas (FERNANDEZ & KIDNEY, 2007), como por exemplo, patologias ósseas (GIANINNI, *et al.*, 2005).

Assim, para confirmar os achados prévios sobre nível sérico de FAT, buscou-se avaliar o comportamento da isoenzima óssea da fosfatase alcalina (FAO). De fato, animais submetidos a 11 dias de periodontite mostraram uma variação dos níveis de FAO bastante importante, indicando uma redução da concentração sérica esta isoenzima, 11 dias após o estímulo inflamatório, o que foi corroborado por outros estudos (KELES *et al.*, 2005; SHOJI *et al.*, 2006).

Dado o proeminente papel do processo inflamatório na patogênese da periodontite, o presente trabalho buscou utilizar uma ferramenta farmacológica que permita a modulação de mediadores, e conseqüentemente a resposta do hospedeiro, sobressaindo-se como uma nova abordagem de tratamento (BUDUNELI *et al.*, 2007; PRESHAW *et al.*, 2004). Assim, a Atorvastatina (ATV), fármaco indicado para o tratamento da hiperlipidemia, mas que também apresenta efeitos secundários importantes, foi utilizada (KRONMANN *et al.*, 2007).

Neste estudo, observou-se que animais, submetidos a 11 dias de periodontite induzida por ligadura e tratados com ATV diariamente, apresentaram proteção significativa dos tecidos de sustentação dentária. Macroscopicamente, animais tratados com ATV (1, 3, 9 e 27 mg/kg) demonstraram redução da destruição óssea de 35%, 39%, 53% e 56%, respectivamente. A análise histológica confirmou os achados macroscópicos, uma vez que animais com periodontite, tratados com ATV (27 mg/kg), apresentaram preservação do processo alveolar e cimento, associado ao discreto infiltrado inflamatório. Ainda, corroborando os achados prévios deste estudo, as densidades radiográficas da região de segundo molares de animais submetidos à periodontite e tratados com ATV (1, 3, 9 mg/kg) mostraram-se preservadas em 5%, 9% e 20%, respectivamente, sendo apenas a maior dose estatisticamente significante.

63

Nossos resultados, em consonância aos publicados na literatura, podem ser explicados pelo efeito anabólico ósseo exercido pela ATV. Este fármaco promove aumento na produção de osteoprotegerina (OPG) (VIERECK *et al.*, 2005), e na transcrição dos genes de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Cbfa1 (KAJINAMI *et al.*, 2003), presentes em células osteoblásticas (MAEDA *et al.*, 2003). Essas células, por sua vez, são responsáveis pela diferenciação e mineralização do tecido ósseo (MAEDA *et al.*, 2003), induzindo assim o aumento da densidade óssea, vista em animais (KAWANE *et al.*, 2004) ou em humanos (PÉREZ-CASTRILLÓN *et al.*, 2008)

após o uso de ATV. Desta forma, destaca-se o papel estabilizador da ATV em osso.

Efeito adicional pleiotrópico da Atorvastatina, também relacionado a processos reabsortivos, consiste em sua atividade antiinflamatória. Estudos mostram que a ATV inibe a expressão de marcadores de estresse oxidativo, causadores de destruição tecidual, como isoprostanos, óxido nítrico sintetase induzida (NOSi) e peroxinitritos (NAWAWI *et al.*, 2003; MATTHEWS *et al.*, 2007; CANGEMI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007; HEEBA *et al.*, 2007). Em adição, diversos marcadores pró-inflamatórios, tais como: ICAM, IL-6 (NAWAWI *et al.*, 2003); IL-1 (WAEHRE *et al.*, 2004); TNF, proteína C-reativa (ARNAUD *et al.*, 2005; MOZAFFARIAN *et al.*, 2005); NF- κ B, bem como RNAm de proteína quimioatraente para monócitos (MCP-1) (ORTEGO *et al.*, 1999; TANIMOTO *et al.*, 2007) e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 α e MIP-1 β), IL-8 e seus receptores (CCR1 e CCR2), TNF- α e IL-1 α (RIAD *et al.*, 2007) sofrem redução da sua expressão após o uso de ATV. Assim, esses achados sugerem que a ATV possui um importante papel na modulação da resposta inflamatória, o que pode explicar os resultados do estudo hematológico, uma vez que os animais submetidos à periodontite e tratados com ATV tiveram revertidos os picos de leucocitose, vistos nos animais do grupo Salina. Portanto, a ATV foi capaz, de certa forma, de modular a resposta inflamatória.

Analisando a variação de massa corpórea dos animais submetidos à periodontite e tratados com ATV, foi possível observar que o tratamento farmacológico reverteu a perda de peso inicial após a ligadura, vista no grupo Salina, mas não foi capaz recuperar a massa corpórea perdida durante o

64
experimento, o que pode ser explicado pelo fato de que a terapia com estatinas não interfere, de forma significativa, no índice de massa corpórea (GEORGESCU & GEORGESCU, 2007).

Considerando que a utilidade clínica de um fármaco baseia-se, além de sua eficácia, também na segurança, buscou-se avaliar o tratamento com ATV em relação a possíveis danos hepáticos ou renais. Foi observado que a ATV não provocou alterações importantes nestes órgãos, quando analisada através de dosagens bioquímicas séricas, com exceção dos níveis de creatinina. No entanto, análises histológicas confirmaram o perfil de segurança da ATV utilizada nesse estudo.

Este foi um achado interessante, pois a elevação na concentração sérica de transaminases muito se associa ao uso de estatinas, principalmente as hidrofílicas (DALE *et al.*, 2007), porém, a ATV é uma estatina lipofílica, o que provavelmente explica os achados obtidos em relação as transaminases (STOLLEY & ITO, 1999). Dosagens séricas de fosfatase alcalina total (FAT) também foram realizadas, com intuito de corroborar os resultados sobre integridade hepática, uma vez que uma injúria induzida por fármacos, neste órgão, em geral apresenta um padrão de colestático, caracterizada por aumento desta enzima (GIANNINI, *et al.*, 2005). Entretanto, foi observado que os animais tratados com ATV mantiveram os níveis de FAT, confirmando a segurança da ATV (KIYICI *et al.*, 2003; STOJAKOVIC *et al.*, 2007).

Em relação à atividade renal, embora alguns ensaios tenham demonstrado que a terapia com estatinas não induz disfunção tubular (PAULSEN *et al.*, 2008) ou altera filtração glomerular mesmo em altas doses (EPSTEIN *et al.*, 2007), nossos achados sugeriram uma alteração significativa

induzida pela ATV apenas nos níveis séricos de creatinina. Contudo, apesar de a creatinina refletir filtração renal (WU & PARIKH, 2008), esta não está linearmente relacionada à taxa de filtração glomerular, sendo frequentemente associada a vieses (SOLOMON & SEGAL, 2008) e considerada, portanto, como um biomarcador de baixa especificidade (VAIDYA *et al.*, 2008). Assim, as análises histológicas dos rins foram preponderantes para a determinação de que a ATV não induziu lesão renal.

Analisando as variações dos níveis de FAO dos animais submetidos

65

à periodontite e tratados com ATV, observou-se que esta isoenzima pouco mostrou alteração em suas concentrações entre os dias 0 e 11, indicando manutenção dos níveis de FAO, mesmo após o estabelecimento da lesão periodontal. A FAO é considerada um marcador bioquímico de formação óssea (KELES *et al.*, 2005), e o aumento na sua expressão (KAJINAMI *et al.*, 2003; MAJIMA *et al.*, 2007), bem como de outros relacionados à formação óssea, tais como a osteocalcina e o gene da proteína morfogênica óssea-2 (BMP-2) (KAJINAMI *et al.*, 2003; RUIZ-GASPA *et al.*, 2007) também foi observado após o uso de ATV, confirmando, assim, nossos achados.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Em suma, os resultados deste estudo mostraram que a ATV promoveu proteção dos tecidos periodontais, avaliada através de análise macroscópica, histológica e radiográfica. Além disso, o tratamento com ATV mostrou-se seguro, pois reverteu a leucocitose, não causou alterações significantes em fígado e rins, manteve os níveis de FAO e não afetou, significativamente, a massa corporal, quando comparada a animais controle.

Portanto, sugere-se que a ATV pode ser uma importante ferramenta farmacológica a ser ensaiada clinicamente como adjuvante à terapia periodontal.

7. REFERÊNCIAS

1. ACHONG, R.; NISHIMURA, I.; RAMACHANDRAN, H.; HOWELL, T.H.; FIORELLINI, J.P.; KARIMBUX, N.Y. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 4, p. 494-500, Apr. 2003.

ALPAGOT, T.; REMIEN, J.; BHATTACHARYYA, M.; KONOPKA, K.; LUNDERGAN, W.; DUZGUNES, N. Longitudinal evaluation of prostaglandin E2 (PGE2) and periodontal status in HIV+ patients. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, n. 11, p. 1102-1108, Nov. 2007.

ARNAUD, C.; BURGER, F.; STEFFENS, S.; VEILLARD, N.R.; NGUYEN, T.H.; TRONO, D.; MACH, F. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 6, p. 1231-1236, Jun. 2005.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J. Immunol.**, v. 160, n. 1, p. 403-409, Jan. 1998.

BARSANTE, M.M.; ROFFÊ, E.; YOKORO, C.M.; TAFURI, W.L.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; CASTRO, M.S.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 516, n. 3, p. 282-289, Jun. 2005.

BEZERRA, J.P.; DA SILVA, L.R.; DE ALVARENGA LEMOS, V.A.; DUARTE, P.M.; BASTOS, M.F. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 12, p. 2356-2360, Dec. 2008.

BEZERRA, M.M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V.B.; VIEIRA, I.B.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, Jun. 2000.

BOEHM, T.K.; SCANNAPIECO, F.A. The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 138, p. 26S-33S, Sep. 2007.

68

BUDUNELI, E.; VARDAR-SENGÜL, S.; BUDUNELI, N.; ATILLA, G.; WAHLGREN, J.; SORSA, T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 1, p. 127-134, Jan. 2007.

CAI, X.; LI, C.; DU, G.; CAO, Z. Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol. Res.**, v. 43, n. 1, p. 14-21, Feb. 2008.

CANGEMI, R.; LOFFREDO, L.; CARNEVALE, R.; PERRI, L.; PATRIZI, M.P.; SANGUIGNI, V.; PIGNATELLI, P.; VIOLI, F. Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E. **Eur. Heart J.**, v. 29, n. 1, p. 54-62, Jan. 2007.

CAVAGNI, J.; SOLETTI, A.C.; GAIO, E.J.; RÖSING, C.K. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Braz. Oral Res.**, v. 19, n. 4, p. 290-294, Oct-Dec. 2005.

CÉSAR-NETO, J.B.; BENATTI, B.B.; NETO, F.H.; SALLUM, A.W.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. Smoking cessation may present a positive impact on

mandibular bone quality and periodontitis-related bone loss: a study in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 4, p. 520-525, Apr. 2005.

COSTA-SCHARPLATZ, M.; RAMANATHAN, K.; FRIAL, T.; BEAMER, B.; GANDHI, S. Cost-effectiveness analysis of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin from a Canadian health system perspective. **Clin. Ther.**, v. 30, n. 7, p. 1345-1357, Jul. 2008.

DALE, K.M.; WHITE, C.M.; HENYAN, N.N.; KLUGER, J.; COLEMAN, C.I. Impact of statin dosing intensity on transaminase and creatine kinase. **Am. J. Med.**, v. 120, n. 8, p. 706-712, Aug. 2007.

DI PAOLA, R.; MARZOCCO, S.; MAZZON, E.; DATTOLA, F.; ROTONDO, F.; BRITTI, D.; DE MAJO, M.; GENOVESE, T.; CUZZOCREA, S. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 4, p. 343-348, Apr. 2004.

EPSTEIN, M.; LEARY, E.; LASKEY, R.; ZUCKERMAN, A.; REED, D.; LOWE, W. Atorvastatin does not induce glomerular or tubular dysfunction even at high doses. **J. Cardiometab. Syndr.**, v. 2, n. 3, p. 163-167, Summer, 2007.

69

FERNANDEZ, N.J.; KIDNEY, B.A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 36, n. 3, p. 223-233, Sep. 2007.

FERREIRA, S.B. Jr.; TROMBONE, A.P.; REPEKE, C.E.; CARDOSO, C.R.; MARTINS, W. Jr.; SANTOS, C.F.; TREVILATTO, P.C.; AVILA-CAMPOS, M.J.; CAMPANELLI, A.P.; SILVA, J.S.; GARLET, G.P. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3725-3734, Aug. 2008.

FIEHN, N.E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R.T. Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. **J. Periodontal. Res.**, v. 27, n. 6, p. 609-614, Nov. 1992.

GENDRON, R.; PLAMONDON, P.; GRENIER, D. Binding of pro-matrix metalloproteinase 9 by Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum as a mechanism to promote the invasion of a reconstituted basement membrane. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 10, p. 6160-6163, Oct. 2004.

GEORGESCU, E.F.; GEORGESCU, M. Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. **J. Gastrointest. Liver Dis.**, v. 16, n. 1, p. 39-46, Mar. 2007.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ.**, v. 172, n. 3, p. 367-379, Feb. 2005.

HEEBA, G.; HASSAN, M.K.; KHALIFA, M.; MALINSKI, T. Adverse balance of nitric oxide/peroxynitrite in the dysfunctional endothelium can be reversed by statins. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 391-398, Oct. 2007.

HONDA, T.; DOMON, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, n. 1, p. 35-40, Apr. 2006.

HUANG, Y.L.; KOU, J.P.; MA, L.; SONG, J.X.; YU, B.Y. Possible Mechanism of the Anti-inflammatory Activity of Ruscogenin: Role of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Nuclear Factor-kappaB. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 108, n. 2, p. 198-205, Oct. 2008.

HWANG, Y.J.; FIEN, M.J.; LEE, S.S.; KIM, T.I.; SEOL, Y.J.; LEE, Y.M.; KU, Y.; RHYU, I.C.; CHUNG, C.P.; HAN, S.B. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 9, p. 1663-1669, Sep. 2008.

INABA, H.; TAGASHIRA, M.; HONMA, D.; KANDA, T.; KOU, Y.; OHTAKE, Y.; AMANO, A. Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 3, p. 527-530, Mar. 2008.

IZUMO, N.; FUJITA, T.; NAKAMUTA, H.; KOIDA, M. Lipophilic statins can be osteogenic by promoting osteoblastic calcification in a Cbfa1- and BMP-2-independent manner. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 23, n. 7, p. 389-394, Sep. 2001.

JIN, Q.; CIRELLI, J.A.; PARK, C.H.; SUGAI, J.V.; TABA, M. JR.; KOSTENUIK, P.J.; GIANNOBILE, W.V. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 7, p. 1300-1308, Jul. 2007.

JORDAN, H.V.; KEYES, P.H.; BELLACK, S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. **J. Periodontol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 21-28, 1972.

KAJINAMI, K.; TAKEKOSHI, N.; MATSUI, S.; KANEMITSU, S.; OKUBO, S.; KANAYAMA, S.; YAMASHITA, N.; SATO, R. Effect of pretreatment vitamin D levels on in vivo effects of atorvastatin on bone metabolism in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 92, n. 9, p. 1113-1136, Nov. 2003.

KANTERS, E.; VAN RIJSSEL, J.; HENSBERGEN, P.J.; HONDIUS, D.; MUL, F.P.; DEELDER, A.M.; SONNENBERG, A.; VAN BUUL, J.D.; HORDIJK, P.L. Filamin B Mediates ICAM-1-driven Leukocyte Transendothelial Migration. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 46, p. 31830-31839, Nov. 2008.

KAWANE, T.; TERASHIMA, S.; KURAHASHI, I.; YANAGAWA, T.; YOSHIDA, H.; HORIUCHI, N. Atorvastatin enhances bone density in ovariectomized rats given 17beta-estradiol or human parathyroid hormone(1-34). **Endocrine**, v. 24, n. 2, p. 121-129, Jul. 2004.

71

KELES, G.G.; ACIKGOZ, G.; AYAS, B.; SAKALLIOGLU, E.; FIRATLI, E. Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, n. 3, p. 176-184, Mar. 2005.

KHOCHT, A.; JANAL, M.; HARASTY, L.; CHANG, K.M. Comparison of direct digital and conventional intraoral radiographs in detecting alveolar bone loss. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, n. 11, p. 1468-1475, Nov. 2003.

KIENER, P.A.; DAVIS, P.M.; MURRAY, J.L.; YOUSSEF, S.; RANKIN, B.M.; KOWALA, M. Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 1, p. 105-118, Jan. 2001.

KIYICI, M.; GULTEN, M.; GUREL, S.; NAK S,G.; DOLAR, E.; SAVCI, G.; ADIM, S.B.; YERCI, O.; MEMIK, F. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 17, n. 12, p. 713-718, Dec. 2003.

KOBAYASHI-SAKAMOTO, M. ; HIROSE, K. ; ISOGAI, E. ; CHIBA, I. NfkappaB-dependent induction of osteoprotegerin by Porphyromonas gingivalis in endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 315, n. 1, p. 107-112,

Feb. 2004.

KRONMANN, L.; HATFIELD, C.; KRONMANN, K. Statin therapy: not just used to lower cholesterol? **Crit. Care Nurs. Q.**, v. 30, n. 2, p. 154-160, Apr-Jun. 2007.

LEE, S.T.; CHU, K.; PARK, J.E.; HONG, N.H.; IM, W.S.; KANG, L.; HAN, Z.; JUNG, K.H.; KIM, M.W.; KIM, M. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. **J. Neurochem.**, v. 104, n. 5, p. 1190-1200, Mar. 2007.

LIMA, V.; BEZERRA, M.M.; DE MENEZES ALENCAR, V.B.; VIDAL, F.D.; DA ROCHA, F.A.; DE CASTRO BRITO, G.A. DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Apr. 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F.D.; ROCHA, F.A.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p. 162-168, Jan. 2004.

72

MADIANOS, P.N.; BOBETSIS, Y.A.; KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, suppl. 6, p. 57-71, 2005.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681-692, Feb. 2003.

MAJIMA, T.; KOMATSU, Y.; FUKAO, A.; NINOMIYA, K.; MATSUMURA, T.; NAKAO, K. Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia. **Endocr. J.**, v. 54, n. 1, p. 145-151, Feb. 2007.

MATTHEWS, J.B.; WRIGHT, H.J.; ROBERTS, A.; LING-MOUNTFORD, N.; COOPER, P.R.; CHAPPLE, I.L. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 8, p. 718-722, Aug. 2007.

McCAREY, D.W.; MCINNES, I.B.; MADHOK, R.; HAMPSON, R.; SCHERBAKOV, O.; FORD, I.; CAPELL, H.A.; SATTAR, N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. **Lancet.**, v. 363, n. 9426, p. 2015-2021, Jun. 2004.

MOZAFFARIAN, D.; MINAMI, E.; LETTERER, R.A.; LAWLER, R.L.; MCDONALD, G.B.; LEVY, W.C. The effects of atorvastatin (10 mg) on systemic inflammation in heart failure. **Am. J. Cardiol.**, v. 96, n. 12, p. 1699-1704, Dec. 2005.

MUNDY, G.; GARRETT, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946-1949, Dec. 1999.

NAPIMOGA, M.H.; BENATTI, B.B.; LIMA, F.O.; ALVES, P.M.; CAMPOS, A.C.; PENA-DOS-SANTOS, D.R.; SEVERINO, F.P.; CUNHA, F.Q.; GUIMARÃES, F.S. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. **Int. Immunopharmacol.**, Dec. 2008 [*in press*]

NAWAWI, H.; OSMAN, N.S.; ANNUAR, R.; KHALID, B.A.; YUSOFF, K. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. **Atherosclerosis**, v. 169, n. 2, p. 283-291, Aug. 2003.

73

NIBALI, L.; TONETTI, M.S.; READY, D.; PARKAR, M.; BRETT, P.M.; DONOS, N.; D'AIUTO, F. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 4, p. 677-683, Apr. 2008.

NICHOLLS, S.J.; TUZCU, E.M.; SIPAHI, I.; SCHOENHAGEN, P.; HAZEN, S.L.; NTANIOS, F.; WUN, C.C.; NISSEN, S.E. Effects of obesity on lipid-lowering, anti-inflammatory, and antiatherosclerotic benefits of atorvastatin or pravastatin in patients with coronary artery disease (from the REVERSAL Study). **Am. J. Cardiol.**, v. 97, n. 11, p. 1553-1557, Jun. 2006.

NILSSON, M.; KOPP, S. Gingivitis and periodontitis are related to repeated high levels of circulating tumor necrosis factor-alpha in patients with rheumatoid arthritis. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 9, p.1689-1696, Sep. 2008.

ORTEGO, M.; BUSTOS, C.; HERNÁNDEZ-PRESA, M.A.; TUÑÓN, J.; DÍAZ, C.; HERNÁNDEZ, G.; EGIDO, J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. **Atherosclerosis**, v. 147, n. 2, p. 253-261, Dec. 1999.

PAULSEN, L.; HOLST, L.M.; BECH, J.N.; STARKLINT, J.; PEDERSEN, E.B. Glomerular filtration rate and blood pressure are unchanged by increased sodium intake in atorvastatin-treated healthy men. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 2, p. 1-7, Dec. 2008.

PÉREZ-CASTRILLÓN, J.L.; ABAD, L.; VEGA, G.; SANZ-CANTALAPIEDRA, A.; GARCÍA-PORRERO, M.; PINACHO, F.; DUEÑAS, A. Effect of atorvastatin on bone mineral density in patients with acute coronary syndrome. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 83-88, mar-apr. 2008.

PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 12, p. 2187-2193, Dec. 2005.

PIHLSTROM, B.L.; MICHALOWICZ, B.S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, Nov. 2005.

PLOSKER, G.L.; LYSENG-WILLIAMSON, K.A. Atorvastatin: a pharmaco-economic review of its use in the primary and secondary prevention of cardiovascular events. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 12, p. 1031-1053, 2007.

74

PRESHAW, P.M.; HEFTI, A.F.; NOVAK, M.J.; MICHALOWICZ, B.S.; PIHLSTROM, B.L.; SCHOOR, R.; TRUMMEL, C.L.; DEAN, J.; VAN DYKE, T.E.; WALKER, C.B.; BRADSHAW, M.H. Subantimicrobial dose doxycycline enhances the efficacy of scaling and root planing in chronic periodontitis: a multicenter trial. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 8, p. 1068-1076, Aug. 2004.

RADVÁR, M.; TAVAKKOL-AFSHARI, J.; BAJESTAN, M.N.; NASEH, M.R.; ARAB, H.R. The effect of periodontal treatment on IL-6 production of peripheral blood monocytes in aggressive periodontitis and chronic periodontitis patients. **Iran. J. Immunol.**, v. 5, n. 2, p. 100-106, Jun. 2008.

REID, P.; HOLEN, I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). **Eur. J. Cell Biol.**, v. 88, n. 1, p. 1-17, Jan. 2009.

RIAD, A.; DU, J.; STIEHL, S.; WESTERMANN, D.; MOHR, Z.; SOBIREY, M.; DOEHNER, W.; ADAMS, V.; PAUSCHINGER, M.; SCHULTHEISS, H.P.; TSCHÖPE, C. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, n. 3, p. 204-211, Aug. 2007.

ROBINSON, M.; HART, D.; PIGOTT, G.H. The effects of diet on the incidence

of periodontitis in rats. **Lab Anim.**, v. 25, n. 3, p. 247-253, Jul. 1991.

RUIZ-GASPA, S.; NOGUES, X.; ENJUANES, A.; MONLLAU, J.C.; BLANCH, J.; CARRERAS, R.; MELLIBOVSKY, L.; GRINBERG, D.; BALCELLS, S.; DÍEZPEREZ, A.; PEDRO-BOTET, J. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. **J. Cell Biochem.**, v. 101, n. 6, p. 1430-1438, Aug. 2007.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U.H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontol. Res.**, v. 17, n. 3, p. 263-274, May. 1982.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Methods Mol. Biol.**, v. 225, p. 291-303, 2003.

SALVI, G.E.; LANG, N.P. Host response modulation in the management of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, suppl. 6, p. 108-29, 2005. 75

SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol. Res.**, v. 25, n. 5, p. 308-315, Sep. 1990.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 19, n. 1, p. 117-125, Feb. 2005.

SHAPIRA, L.; WILENSKY, A.; KINANE, D.F. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, suppl. 6, p. 72-86, 2005.

SHOJI, M.; TANABE, N.; MITSUI, N.; TANAKA, H.; SUZUKI, N.; TAKEICHI, O.; SUGAYA, A.; MAENO, M. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblasts. **Life Sci.**, v. 78, n. 17, p. 2012-2018, Mar. 2006.

SIMCH, R.P.; GAIO, E.J.; ROSING, C.K. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Acta Odontol. Scand.**, v. 66, n. 3, p. 130-134, Jun. 2008.

SOEDARSONO N, RABELLO D, KAMEI H, FUMA D, ISHIHARA Y, SUZUKI M, NOGUCHI T, SAKAKI Y, YAMAGUCHI A, KOJIMA T. Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 397-404, Oct. 2006.

SOLOMON, R.; SEGAL, A. Defining acute kidney injury: what is the most appropriate metric? **Nat. Clin. Pract. Nephrol.**, v. 4, n. 4, p. 208-215, Apr. 2008.

STOJAKOVIC, T.; PUTZ-BANKUTI, C.; FAULER, G.; SCHARNAGL, H.; WAGNER, M.; STADLBAUER, V.; GURAKUQI, G.; STAUBER, R.E.; MÄRZ, W.; TRAUNER, M. Atorvastatin in patients with primary biliary cirrhosis and incomplete biochemical response to ursodeoxycholic acid. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 776-784, Sep. 2007.

STOLLEY, S.N.; ITO, M.K. Lipophilic nature of atorvastatin. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 56, n. 19, 1988-1989, Oct. 1999.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J. Periodontol. Res.**, v. 40, n. 4, p. 287-293, Aug. 2005. 76

TANIMOTO, A.; MURATA, Y.; WANG, K.Y.; TSUTSUI, M.; KOHNO, K.; SASAGURI, Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 8, p. 4643-4651, Feb. 2007.

TELES, R.P.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol.** 2000, v. 42, p. 180-218, 2006.

VAIDYA, V.S.; FERGUSON, M.A.; BONVENTRE, J.V. Biomarkers of acute kidney injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 463-493, 2008.

VAN DER STELT, P.F. Filmless imaging: the uses of digital radiography in dental practice. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 136, n. 10, p. 1379-1387, Oct. 2005.

VIERECK, V.; GRÜNDKER, C.; BLASCHKE, S.; FROSCH, K.H.; SCHOPPET, M.; EMONS, G.; HOFBAUER, L.C. Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. **J. Cell Biochem.**, v. 96, n. 6, p. 1244-1253, Dec. 2005.

WAEHRE, T.; YNDESTAD, A.; SMITH, C.; HAUG, T.; TUNHEIM, S.H.; GULLESTAD, L.; FRØLAND, S.S.; SEMB, A.G.; AUKRUST, P.; DAMÅS, J.K. Increased expression of interleukin-1 in coronary artery disease with downregulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Circulation**, v. 109, n. 16, p. 1966-1972, Apr. 2004.

WEINBERG, M.A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, n. 6, p. 335-340, Jun. 1999.

WU, I.; PARIKH, C.R. Screening for kidney diseases: older measures versus novel biomarkers. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 6, p. 1895-1901, Nov. 2008.

XING, L.; SCHWARZ, E.M.; BOYCE, B.F. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. **Immunol. Rev.**, v. 208, p. 19-29, Dec. 2005.