

Avaliação do comportamento das fibras colágenas periodontais durante a progressão da periodontite experimental em ratos

Evaluation of the behaviour of periodontal collagen fibers during the progression of experimental periodontitis in rats

Matheus Esnel GARCIA^a , Felipe de Lima FARIA^a , Bianca DAL OCA COSTA SILVA^a ,
Edilson ERVOLINO^b , Vivian Cristina Noronha NOVAES^a , Luan Felipe TORO^{a,b*}

^aUNIFUNEC – Centro Universitário de Santa Fé do Sul, Santa Fé do Sul, SP, Brasil

^bUNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, SP, Brasil

Como citar: Garcia ME, Faria FL, Dal Oca Costa Silva B, Ervolino E, Novaes VCN, Toro LF. Avaliação do comportamento das fibras colágenas periodontais durante a progressão da periodontite experimental em ratos. Rev Odontol UNESP. 2023;52:e20230011. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.01123>

Resumo

Introdução: A periodontite é uma doença infecto-inflamatória, resultante da disbiose microbiana e da resposta do hospedeiro, que leva à destruição dos tecidos de suporte dentário, inclusive das fibras colágenas periodontais, podendo culminar na perda do elemento dental. **Objetivo:** Avaliar o comportamento das fibras colágenas periodontais durante a progressão da periodontite experimental induzida em ratos. **Material e método:** Doze ratos Wistar foram distribuídos nos grupos: Controle (C), Periodontite Experimental 14-dias (PE-14d), Periodontite Experimental 21-dias (PE-21d) e Periodontite Experimental 42-dias (PE-42d). No dia 0, os animais do grupo C foram eutanasiados. Neste mesmo dia, os animais remanescentes foram submetidos à instalação de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo para indução da periodontite experimental. Tais animais foram eutanasiados aos 14 (PE-14d), 21 (PE-21d) e 42 (PE-42d) dias após a instalação da ligadura. Executou-se o processamento histológico das hemimandíbulas e as secções foram submetidas à reação histoquímica pelo vermelho picro-sirius. A análise qualitativa descritiva foi realizada sob microscopia de luz polarizada, na região de furca dental, evidenciando as fibras do ligamento periodontal. **Resultado:** O grupo C exibiu feixes espessos e orientados de fibras colágenas maduras, condizentes com aspecto de normalidade. Os grupos com periodontite experimental exibiram desestruturação tecidual severa, com fibras colágenas imaturas e de menor espessura, sendo tais condições mais exacerbadas nos grupos PE-14d e PE-21d. **Conclusão:** As fases iniciais da periodontite apresentam caráter agudo e, portanto, resultam na rápida destruição dos tecidos periodontais de suporte, prejudicando potencialmente a fibrilogênese e a reestruturação do colágeno no ligamento periodontal.

Descritores: Colágeno; periodontite; periodonto.

Abstract

Introduction: Periodontitis is an infectious-inflammatory disease resulting from microbial dysbiosis and host response that leads to the destruction of tooth support tissues, including periodontal collagen fibers, which may culminate in tooth loss. **Objective:** To evaluate the behavior of periodontal collagen fibers during the progression of induced experimental periodontitis in rats. **Material and method:** Twelve Wistar rats were distributed into groups: Control (C), 14-days Experimental Periodontitis (PE-14d), 21-days Experimental Periodontitis (PE-21d) and 42-days Experimental Periodontitis (PE-42d). At day 0, the animals of group C were euthanized. At the same day, the remaining animals were submitted to the installation of a cotton ligature around the lower left first molar for the induction of experimental periodontitis. The animals were euthanized at 14 (PE-14d), 21 (PE-21d) and 42 (PE-42d) days after the installation of ligature. Histological processing



of the hemi-mandibles was performed and the sections underwent histochemical reaction using picro-sirius red. The descriptive qualitative analysis was performed under polarized light microscopy, in the dental furcation region, evidencing the fibers of the periodontal ligament. **Result:** Group C exhibited thick and oriented bundles of mature collagen fibers, consistent with a normal appearance. The groups with experimental periodontitis exhibited severe tissue disruption, with immature and thinner collagen fibers, with such conditions being more exacerbated in the PE-14d and PE-21d groups. **Conclusion:** The early stages of periodontitis present acute response, and therefore result in rapid destruction of periodontal support tissues and potentially impair fibrillogenesis and collagen restructuring in the periodontal ligament.

Descriptors: Collagen; periodontitis; periodontium.

INTRODUÇÃO

Os dentes são verdadeiros órgãos, constituídos por tecidos especializados próprios - esmalte, dentina e polpa - e situados na cavidade bucal, local em que exercem suas funções de mastigação, fonação e estética¹. Porém, para que tais elementos desempenhem adequadamente estes papéis, é necessário que estejam firmemente inseridos e ancorados em seus respectivos alvéolos ósseos, tanto nas maxilas quanto na mandíbula. Assim, as estruturas responsáveis pela proteção e sustentação dos dentes na cavidade bucal compõem um grupo de tecidos especialmente denominado de periodonto².

O periodonto pode ser dividido em dois principais grupos: o periodonto de proteção (marginal ou de revestimento), constituído por um tecido epitelial de revestimento e a sua lâmina própria, originando a gengiva; e o periodonto de inserção (ou de sustentação), constituído pelo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, três tecidos de natureza conjuntiva². O periodonto de inserção desenvolve-se durante a fase de rizogênese dos dentes, a partir das células ectomesenquimais que constituem o folículo dentário^{3,4}. Após a diferenciação das células mais periféricas da papila dentária em odontoblastos e a consequente produção da dentina radicular, a estrutura epitelial denominada de bainha epitelial radicular de Hertwig sofre fragmentação, possibilitando o contato da dentina recém sintetizada com o folículo dentário ainda indiferenciado. Esta interação celular, por meio de mediadores químicos, promove a gradual e concomitante diferenciação das células do folículo dentário em cementoblastos, os quais produzirão a matriz orgânica intrínseca do cemento celular; em fibroblastos, os quais produzirão a substância fundamental e os componentes fibrosos da matriz extracelular do ligamento periodontal; e em osteoblastos, os quais produzirão a matriz orgânica do osso alveolar^{2,4}.

Cemento e osso alveolar são tecidos conjuntivos mineralizados com propriedades especiais. Apresentam suas células próprias e são constituídos por uma matriz orgânica, composta, predominantemente, por colágeno e outras proteínas não colagenosas, e por uma matriz inorgânica, representada pelos cristais de fosfato e cálcio sob a forma de hidroxiapatita⁵. Enquanto o osso alveolar recobre o osso do processo alveolar, o cemento reveste a dentina da região radicular dos dentes, à qual encontra-se firmemente aderido. Entre estas duas estruturas, localiza-se o ligamento periodontal, um tecido conjuntivo denso, particularmente atravessado por espessos feixes de fibras de colágeno do tipo I, denominados de fibras principais do ligamento periodontal⁵. Fibroblastos, células ectomesenquimais indiferenciadas, células inflamatórias, restos epiteliais de Malassez, nervos e terminações nervosas, vasos sanguíneos e outros tipos de fibras também são elementos característicos presentes no ligamento periodontal⁵. As porções terminais das fibras colágenas do ligamento periodontal adentram de um lado no cemento, e do outro no osso alveolar, locais em que se mineralizam e passam a ser denominadas de fibras de Sharpey. Com isso, estas fibras que atuam como uma verdadeira articulação do tipo gonfrose, ancoram e sustentam firmemente o dente em sua

posição no alvéolo dental, resistindo às forças de intrusão, extrusão e lateralidade que atuam na cavidade bucal⁶.

Assim como qualquer outro tecido e órgão do corpo humano, os tecidos periodontais também estão suscetíveis a alterações patológicas decorrentes das mais variadas formas de agressão. A periodontite é uma doença infecto-inflamatória resultante da disbiose microbiana periodontal e da resposta do hospedeiro susceptível. A lesão imune-inflamatória descontrolada causa danos aos tecidos periodontais e impede a eficaz eliminação das bactérias presentes na região⁷. A periodontite crônica é clinicamente caracterizada por perda de inserção do tecido gengival, aprofundamento do sulco gengival (denominado de bolsa periodontal), degradação do ligamento periodontal e perda progressiva do osso alveolar. Este processo destrutivo pode levar à perda do dente se não for tratado adequadamente⁸. Na gengivite, uma forma reversível da doença periodontal, que não resulta em perda óssea, o processo inflamatório está restrito ao epitélio e à lâmina própria gengival, sem afetar os tecidos mais profundos do periodonto. Assim, a inserção de tecido conjuntivo permanece em sua posição original^{8,9}. No entanto, deve-se observar que a gengivite é o principal fator de risco e um pré-requisito para a ocorrência da periodontite, sendo importante sua identificação e o entendimento da degradação tecidual que ocorre nesta fase, como fator preditivo da periodontite¹⁰.

Em um primeiro estudo sobre os eventos celulares das lesões periodontais, Page, Schroeder¹¹ definiram diferentes tipos de lesões histopatológicas: as lesões iniciais, precoces e estabelecidas, exemplificando estágios distintos e sequenciais de gengivite, e a lesão avançada, com perda óssea, caracterizando clinicamente a periodontite. O estudo observou que nos estágios referentes à gengivite notou-se proliferação lateral do epitélio juncional, aumento do infiltrado inflamatório, com o predomínio de plasmócitos e linfócitos B, presentes no estágio de lesão estabelecida. Além disso, os autores descreveram lesões em fibroblastos e perda de fibras colágenas, especialmente nos grupos de fibras circulares e dentogengivais¹¹.

Sabe-se que o processo inflamatório da doença periodontal causa a destruição da matriz extracelular. Há ainda evidências significativas de que as collagenases, juntamente com outras metaloproteinases da matriz (MMPs), desempenham papéis importantes na destruição periodontal^{7,9}. A ativação das MMPs envolve proteinases teciduais e de plasma e proteinases bacterianas, juntamente com o estresse oxidativo. Citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas pró-inflamatórias, estimulam a produção de MMPs, desempenhando um importante papel na degradação da matriz extracelular, especialmente das fibras colágenas. A principal enzima degradadora do colágeno na periodontite é a MMP-8, produzida, principalmente, por neutrófilos, o que evidencia a forte correlação entre o processo inflamatório e a degradação tecidual⁹.

Ratificando-se o potencial destrutivo e de degradação dos tecidos periodontais, em especial das fibras colágenas de ancoragem presentes no ligamento periodontal, frente à evolução da periodontite, faz-se necessária a avaliação e a determinação dos períodos mais cruciais da patogênese desta condição, sendo estes importantes indicativos dos momentos mais adequados à intervenção e tratamento, com o objetivo de se evitar a perda total dos tecidos de suporte e do elemento dental, por consequência. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de análise em microscopia de luz polarizada, o comportamento das fibras colágenas periodontais durante a progressão da periodontite experimental induzida em ratos, descrevendo os padrões de degradação e/ou neoformação de tais fibras ao longo de diferentes períodos evolutivos da doença.

METODOLOGIA

No presente estudo foram utilizados 12 ratos (6 meses de idade), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso corporal médio de 350g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP) e, posteriormente, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas, onde tiveram livre acesso ao alimento e à água. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, bem como evitar seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), sendo o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP (Processo FOA nº. 0226-2022; 25/04/2022).

Delineamento Experimental

Anestesia Geral

Durante os procedimentos experimentais que envolveriam dor ou necessidade de imobilização por um tempo prolongado, ou seja, para instalação da ligadura de algodão e eutanásia, os animais foram devidamente anestesiados, via injeção intramuscular, de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg; Francotar®, Virbac, São Paulo/SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg; Rompum®, Bayer, Porto Alegre/RS, Brasil).

Grupos Experimentais

Os animais (N=12) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: **Controle (C; n=03)**, **Periodontite Experimental 14-dias (PE-14d; n=03)**, **Periodontite Experimental 21-dias (PE-21d; n=03)** e **Periodontite Experimental 42-dias (PE-42d; n=03)**. No dia 0 (zero), previamente à realização de qualquer tipo de procedimento experimental (para análise das características do periodonto saudável), os animais do grupo C foram eutanasiados. Ainda neste dia, foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de todos os animais remanescentes, com o intuito de induzir a periodontite experimental. A ligadura foi mantida em posição a nível subgingival e a eutanásia destes animais foi efetuada aos 14 (grupo PE-14d), 21 (grupo PE-21d) e 42 dias (grupo PE-42d) após a instalação das ligaduras (Figura 1A).

Periodontite Experimental Induzida por Ligadura

Para indução da periodontite experimental, foi instalada uma ligadura de algodão (fio #24; Coats Corrente, São Paulo/SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo dos animais, para o acúmulo de biofilme bacteriano local e o consequente desencadeamento da periodontite experimental^{12,13}. Para isso, os animais foram devidamente posicionados em mesa operatória e, após a realização da antisepsia intraoral com solução de digluconato de clorexidina 0,12%, foi realizada a inserção do fio de algodão no espaço interdental entre o primeiro e o segundo molar inferior esquerdo, com o auxílio de uma pinça odontológica adaptada. Em seguida, foi realizada a amarra de tal fio com nó duplo em torno do primeiro molar inferior esquerdo, posicionando-se a ligadura na região do sulco gengival (Figura 1B-D). No primeiro molar inferior direito dos animais não foi instalada qualquer ligadura.

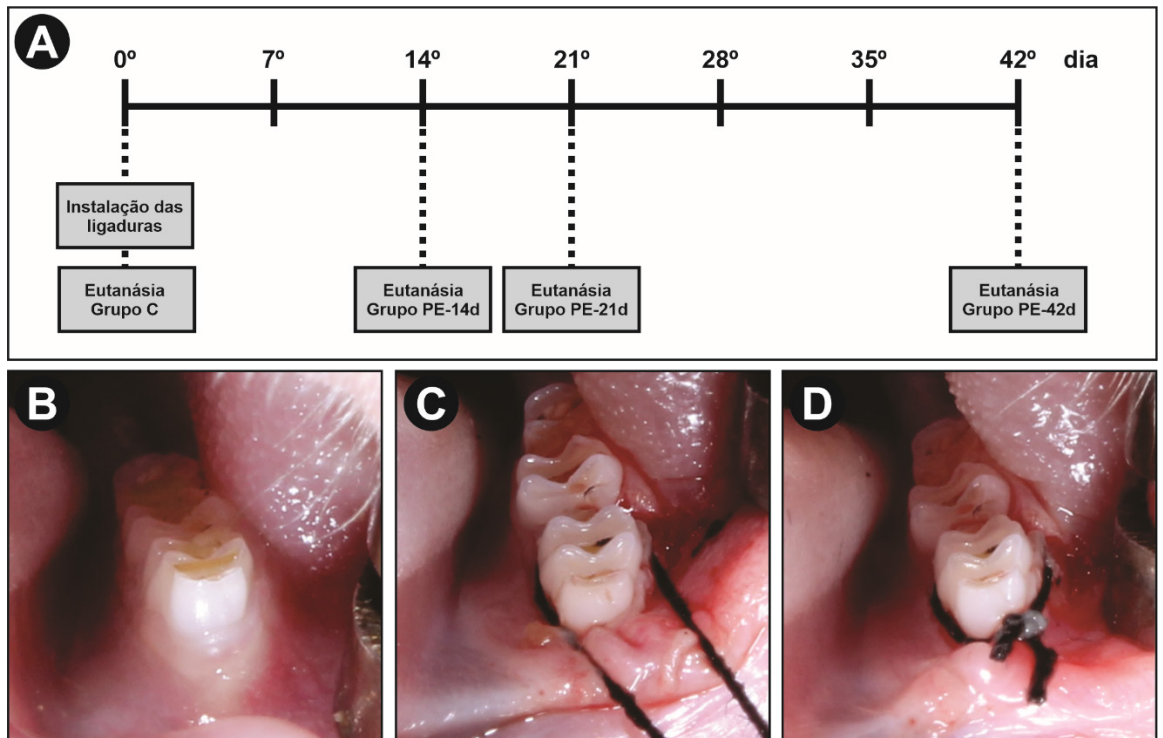


Figura 1. Fluxograma do estudo evidenciando os procedimentos experimentais executados em seus respectivos intervalos de tempo (A). Instalação da ligadura de algodão para indução da periodontite experimental, com destaque para os molares inferiores em evidência após o posicionamento do animal em mesa operatória e afastamento dos tecidos bucais adjacentes (B), inserção do fio no espaço interdental entre o primeiro e segundo molar inferior esquerdo (C), e amarração com nó duplo em torno do primeiro molar inferior esquerdo e seu posicionamento na região do sulco gengival (D).

Eutanásia e Obtenção das Amostras

Aos 14, 21 e 42 dias após instalação da ligadura, assim como para os animais do grupo C, após minucioso exame clínico intrabucal, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de cloreto de sódio 0,9% acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma®, Saint Louis/MO, Estados Unidos da América) em tampão fosfato-salino. As hemimandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora por um período de 48 horas.

Processamento Histológico das Amostras

As hemimandíbulas foram então submetidas à lavagem em água corrente e imersas em solução desmineralizadora, constituída de tampão fosfato-salino acrescido de 10% de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), durante 30 dias. Após a desmineralização, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas pelo etanol, diafanizadas pelo xilol, impregnadas e incluídas na parafina histológica e, por fim, seccionadas em micrótomo com 4µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte que progrediu de vestibular para lingual. Foram coletados os cortes seriados correspondentes à região de furca do primeiro molar inferior esquerdo. As secções histológicas foram então montadas em lâminas de vidro para microscopia (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais, São José dos Pinhais/PR, Brasil) impregnadas por polilissina, previamente à reação histoquímica subsequente.

Reação Histoquímica pelo Vermelho Picro-Sirius

Para a análise do comportamento das fibras colágenas periodontais, as secções histológicas foram submetidas à reação histoquímica pelo vermelho picro-sirius. Para isso, as lâminas histológicas contendo as amostras de cada grupo experimental passaram pelo processo de desparafinização inicial em estufa com temperatura controlada (56° a 58°C), durante, aproximadamente, 30 minutos, seguida pela desparafinização completa pelo xilol, hidratação pelo etanol em sequência decrescente de concentração (100° a 70°GL) e, finalmente, imersão no corante vermelho picro-sirius, durante 45 minutos. Em seguida, tais lâminas foram banhadas pelo etanol em sequência crescente de concentração (70° a 100°GL), banhadas pelo xilol e, por fim, recobertas com meio de montagem (Permount®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/MA, Estados Unidos da América) e protegidas com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).

Análise dos Resultados

Para possibilitar a realização das análises microscópicas foi utilizado um sistema composto por um microscópio de luz polarizada (Axio Scope®, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen/BW, Alemanha) com câmera digital acoplada (AxioCam® MRc5, Carl Zeiss Microscopy GmbH), conectadas ao computador. As fotomicrografias das lâminas histológicas foram capturadas na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, com o auxílio do software ZEN 2 (Blue edition; Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Após a captura das respectivas fotomicrografias, as análises histoquímicas foram realizadas por um histologista certificado (L.F.T.), devidamente calibrado e cego aos grupos experimentais. Descreveu-se então o comportamento observado das fibras colágenas periodontais na região inter-radicular, evidenciando: padrão de distribuição, localização e maturação das fibras colágenas no ligamento periodontal saudável (grupo C), padrão de distribuição, localização, maturação e degradação e/ou neoformação das fibras colágenas no ligamento periodontal durante a progressão da periodontite experimental aos 14, 21 e 42 dias (grupos PE-14d, PE-21d e PE-42d).

RESULTADO

Condições Gerais de Saúde dos Animais e Exame Clínico Intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram constantes durante o período experimental, sendo que estes toleraram bem todos os procedimentos executados. Ao exame clínico intrabucal, realizado previamente à eutanásia, não foi constatada nenhuma alteração macroscópica na cavidade bucal. Houve grande acúmulo de placa bacteriana na ligadura instalada ao redor do primeiro molar inferior esquerdo dos animais dos grupos PE-14d, PE-21d e PE-42d, com a presença de edema e eritema gengival de intensidade moderada e perda óssea alveolar clinicamente detectável. Entretanto, não houve a perda de nenhum dos elementos dentários envolvidos.

Análise Histoquímica do Comportamento das Fibras Colágenas Periodontais

No grupo C, as fibras colágenas principais inter-radulares existentes no ligamento periodontal se mostravam organizadas em feixes espessos e bem orientados, ocupando a totalidade do espaço periodontal, com nítida inserção desde o cimento até o osso alveolar. Tais fibras ainda exibiam coloração, predominantemente, laranja-avermelhada sob luz polarizada, ou seja, aspecto condizente com o de fibras colágenas maduras e em condições de normalidade (Figura 2A-B).

No grupo PE-14d observou-se intensa desestruturação tecidual na região do ligamento periodontal, com a presença de grande quantidade de delicadas fibras colágenas, sem orientação definida e inserção nítida. O aumento expressivo dos espaços ocupados pela substância fundamental amorfa e outros elementos não fibrosos da matriz extracelular demonstrou a diminuição da quantidade de fibras colágenas principais nesta região. Ademais, as fibras presentes ainda exibiam coloração, predominantemente, amarelo-esverdeada sob luz polarizada, ou seja, aspecto condizente com o de fibras colágenas imaturas (Figura 2C-D).

No grupo PE-21d também foi observada desestruturação tecidual na região do ligamento periodontal, entretanto, ligeiramente de menor intensidade quando comparada ao grupo PE-14d. Foram observados escassos feixes espessos de fibras colágenas principais e a presença de grande quantidade de delicadas fibras, sendo que algumas se mostravam com orientação definida, porém, a maioria ainda se apresentava desorientada e sem inserção nítida. A coloração de tais fibras sob luz polarizada reflete o estágio inicial de maturação, com o predomínio do aspecto amarelo-esverdeado e escassas regiões laranja-avermelhadas (Figura 2E-F).

No grupo PE-42d observou-se desestruturação tecidual moderada na região do ligamento periodontal, entretanto, nitidamente de menor intensidade quando comparada aos grupos PE-14d e PE-21d. Apesar da grande quantidade de delicadas fibras colágenas desorientadas, observou-se a presença de feixes espessos e bem orientados, com inserção nítida. Tais fibras ainda exibiam coloração variando desde o amarelo-esverdeado, aspecto condizente com o de fibras colágenas imaturas e/ou em maturação, até o laranja-avermelhado, aspecto condizente com o de fibras colágenas mais maduras (Figura 2G-H).

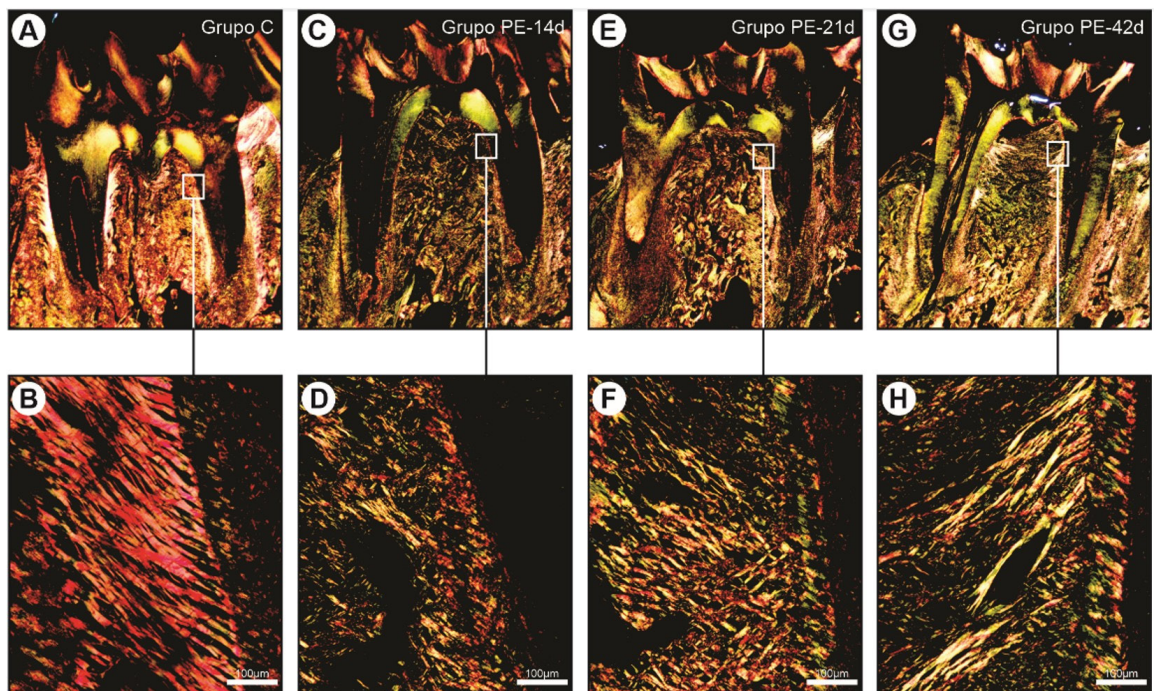


Figura 2. Aspecto histológico dos tecidos dentais, periodontais e adjacências sob luz polarizada, com destaque para a região do ligamento periodontal nos grupos C (A-B), PE-14d (C-D), PE-21d (E-F) e PE-42d (G-H). Coloração: vermelho picro-sírius. Aumentos originais: 25x (A, C, E, G) e 400x (B, D, F, H). Barras de escala: 100µm (B, D, F, H).

DISCUSSÃO

A doença periodontal é caracterizada por um grupo de condições inflamatórias específicas, de caráter agudo e/ou crônico, originadas primariamente pelo acúmulo de bactérias em biofilmes, e

que afeta os tecidos periodontais de proteção, podendo levar, com o tempo, à perda dos tecidos de suporte dentário¹⁴. Em primeira instância, ocorre um grande desequilíbrio entre os microrganismos patogênicos e não-patogênicos da cavidade oral e os mecanismos de defesa do hospedeiro, o que resulta em alterações celulares, vasculares e na conseqüente formação de exsudato inflamatório, com grande potencial para destruição tecidual¹⁵. Desta forma, como as fibras colágenas do ligamento periodontal são os principais elementos envolvidos na sustentação e ancoragem dos dentes aos seus alvéolos ósseos, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de análise em microscopia de luz polarizada, o comportamento de tais fibras durante a progressão da periodontite experimental induzida em ratos.

Clinicamente, a doença periodontal se manifesta pela presença de placa bacteriana, eritema, edema e sangramento gengival, sensibilidade, aumento do exsudato gengival, perda de inserção conjuntiva, presença de bolsas periodontais e perda óssea alveolar¹⁶. Algumas destas características foram nitidamente observadas nos animais do presente estudo que tiveram a periodontite induzida por ligadura (grupos PE-14d, PE-21d e PE-42d). Nestes animais observou-se o grande acúmulo de placa bacteriana ao redor da ligadura de algodão, com a presença de edema e eritema gengival de intensidade moderada, além de perda óssea alveolar clinicamente detectável, o que assegura a efetividade do método utilizado para a indução da condição estudada.

Deste modo, a ligadura de algodão alocada ao redor do primeiro molar inferior dos animais teve como principal função atuar como fator retentivo de placa bacteriana e agir como corpo estranho, danificando fisicamente a barreira proporcionada pelos tecidos periodontais de revestimento e diminuindo a capacidade de defesa do hospedeiro, o que resultou em inflamação local e, conseqüentemente, na destruição das fibras colágenas presentes no periodonto como um todo^{12,13}.

Neste contexto, outros métodos também foram empregados e se encontram descritos na literatura científica como efetivos para a indução da periodontite experimental. Marcondes et al.¹⁷ preconizaram a inserção de duas voltas de fio de poliéster ao redor dos primeiros molares inferiores, observando, durante a avaliação microscópica, perda óssea alveolar já a partir do primeiro dia após a indução da doença, atingindo o seu pico no 14º dia, e com estabilização característica somente após 42 dias. De acordo com Sun et al.¹⁸, outro modelo experimental também comumente utilizado é a injeção localizada de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos na região do sulco gengival. Os LPS são constituintes da parede celular de algumas bactérias, sendo encontrados praticamente em todos os organismos Gram-negativos, os principais responsáveis pela iniciação e manutenção da doença periodontal. A injeção destas substâncias perfaz um método mais direto e controlado de indução da periodontite, contudo, apesar da sensibilidade e precisão na indução da resposta do hospedeiro, tal modelo não se assemelha à doença periodontal humana devido à ausência da colonização bacteriana propriamente dita¹⁸.

Diante disso, no presente estudo observou-se que a presença da ligadura de algodão acarretou um efeito deletério sobre os tecidos situados ao redor do dente em questão, contribuindo diretamente para a progressão dos estágios da doença. Assim, para a avaliação microscópica das fibras colágenas periodontais durante estes diferentes estágios da periodontite experimental realizou-se, conforme descrito por Ganganna et al.¹⁹, a coloração das amostras pelo vermelho *picro-sirius* (*picro-sirius red*). Tal coloração é caracterizada como uma reação histoquímica, com efetiva afinidade molecular pela proteína colágeno, principal componente da porção fibrosa da matriz extracelular dos tecidos de origem conjuntiva. Assim, quando analisada sob microscopia de luz polarizada, é considerada a histotécnica padrão-ouro para visualização e análise das fibras colágenas, possibilitando, inclusive, a identificação das fibras imaturas, as quais se apresentam em coloração amarelo-esverdeada, e das fibras maduras, exibindo uma coloração laranja-avermelhada, conforme fora observado nestes resultados¹⁹.

As diferentes agressões resultantes da indução e/ou progressão da doença periodontal desencadeiam uma potente resposta imune-inflamatória no hospedeiro, com o envolvimento e participação de diversos tipos celulares, dentre eles células residentes e migratórias, as quais

produzem uma gama de mediadores do processo, tais como as quimiocinas, citocinas e enzimas²⁰. Assim, a inflamação pode compreender um conjunto de alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, de acordo com a intensidade de agressão dos mais variados estímulos nocivos ao organismo. Com a resposta na fase aguda, há um importante aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, sendo os leucócitos então recrutados para o foco da lesão e ocorrendo a liberação de potentes mediadores inflamatórios. Nesta fase, o potencial de destruição dos tecidos locais é bastante elevado, culminando com a desestruturação dos elementos extracelulares e, até mesmo, com a morte das células típicas. No momento de transição para a fase crônica, no entanto, a inflamação exibe como características o desenvolvimento de uma resposta humoral específica e da resposta imunológica inata, de baixo grau, latente e regularmente assintomática, o que possibilita a concomitante reparação e neoformação dos tecidos previamente destruídos durante a fase aguda do processo inflamatório²¹.

Assim, no presente estudo, para que se obtivesse uma análise comparativa das fibras colágenas maduras e em condições de normalidade com os demais grupos em que a doença se fez presente, não foi instalada qualquer ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior dos animais do grupo C. Posto isso, o referido grupo apresentou fibras colágenas espessas e maduras, com distribuição regular e uniforme. Diferentemente, entretanto, nos grupos PE-14d e PE-21d, nos quais a periodontite experimental foi induzida, ocorreu grande destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal, exibindo um aspecto condizente com a fase aguda da doença, a qual levou à maior destruição nos dias iniciais pós indução, resultando em fibras mais delicadas, imaturas e com distribuição irregular na região inter-radicular. Toro et al.¹², utilizando a mesma metodologia para indução da periodontite experimental em ratos, também observaram características histopatológicas semelhantes às descritas anteriormente aos 14 dias após a indução da doença, com a presença de intenso infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais e aumento na quantidade de citocinas pró-inflamatórias, tanto para os grupos sistemicamente saudáveis, quanto para os grupos comprometidos pela medicação em estudo.

O grupo PE-42, por sua vez, foi o que apresentou o maior período de permanência da ligadura em posição, levando, portanto, à cronificação da condição infecto-inflamatória induzida. Deste modo, ainda foi possível observar desestruturação tecidual importante no ligamento periodontal, porém, com a formação de novos feixes de fibras colágenas, sendo estes já mais maduros e relativamente bem distribuídos e orientados quando comparados aos demais grupos. Todavia, tais aspectos não devem ser considerados como característicos de uma fase de cura e/ou mesmo estabilização da doença periodontal, uma vez que esta alteração apresenta etiologia complexa e multifatorial e, nas condições supracitadas, tais agentes etiológicos não foram controlados e, tampouco, removidos²².

CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo conclui-se que as fases iniciais da periodontite apresentam caráter agudo e, portanto, resultam na rápida destruição dos tecidos periodontais de suporte e prejudicam potencialmente a fibriologênese e a reestruturação do colágeno no ligamento periodontal. Deste modo, o cirurgião-dentista deve estar atento para prevenir, preferencialmente, intervir e tratar de forma efetiva as doenças periodontais ainda em seu estágio inicial, evitando assim o grave comprometimento dos tecidos de sustentação e, por consequência, a perda da inserção e do próprio elemento dentário.

REFERÊNCIAS

1. Balic A. Biology explaining tooth repair and regeneration: a mini-review. *Gerontology*. 2018;64(4):382-8. <http://dx.doi.org/10.1159/000486592>. PMID:29533942.

2. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):11-28. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>. PMID:16398683.
3. Bastos VC, Gomez RS, Gomes CC. Revisiting the human dental follicle: from tooth development to its association with unerupted or impacted teeth and pathological changes. *Dev Dyn*. 2022 Mar;251(3):408-23. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.406>. PMID:34324745.
4. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24(1):9-27. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x>. PMID:11276876.
5. Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*. 1993 Oct;3(1):9-38. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00230.x>. PMID:9673156.
6. Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2017 Dec;52(6):965-74. <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12477>. PMID:28635007.
7. Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol 2000*. 2020 Feb;82(1):205-13. <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12317>. PMID:31850636.
8. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34(1):9-21. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.003421.x>. PMID:14717852.
9. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):57-80. <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12002>. PMID:24320956.
10. Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017 Dec;44(12):1182-91. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12782>. PMID:28733997.
11. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976 Mar;34(3):235-49. PMID:765622.
12. Toro LF, Mello-Neto JM, Issa JPM, Gonçalves A, Theodoro LH, Garcia VG, et al. Resposta imune-inflamatória durante a progressão da periodontite experimental ao longo do tratamento com zoledronato. *Braz Oral Res*. 2017;31(Suppl 2):386.
13. Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, de Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Jul;184:7-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004>. PMID:29777942.
14. Silva GCB, Melo OM No, Nascimento AMV, Santos CAO, Nóbrega WFS, Souza SLX. Natural history of periodontal disease: a systematic review. *Res Soc Dev*. 2020;9(7):e607974562. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4562>.
15. Almeida RF, Pinho MM, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Port Med Geral Fam*. 2006;22(3):379-90.
16. Steffens JP, Marcantonio RAC. Classificação das doenças e condições peri-implantares 2018: guia prático e pontos-chave. *Rev Odontol UNESP*. 2018;47(4):189-97. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.04704>.
17. Marcondes MS, Gomes FC, Anbinder AL. Influência do tratamento com sinvastatina na periodontite induzida em ratos. *Rev Bras Odontol*. 2008;65(1):122-5.
18. Sun J, Eberhard J, Glage S, Held N, Voigt H, Schwabe K, et al. Development of a peri-implantitis model in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2020 Mar;31(3):203-14. <http://dx.doi.org/10.1111/clr.13556>. PMID:31701561.

19. Ganganna K, Shetty P, Shroff SE. Collagen in histologic stages of oral submucous fibrosis: a polarizing microscopic study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May;16(2):162-6. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.98446>. PMID:22923884.
20. Lima HG, Lara VS. Aspectos imunológicos da doença periodontal inflamatória: participação dos mastócitos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2013;15(3):225-9.
21. Geraldo JM, Alfenas RC. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica: evidências atuais. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):951-67. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302008000600006>. PMID:18820806.
22. Yared KFG, Zenobio EG, Pacheco W. A etiologia multifatorial da recessão periodontal. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial*. 2006;11(6):45-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-54192006000600007>.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

***AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA**

Luan Felipe Toro, UNIFUNEC – Centro Universitário de Santa Fé do Sul, Câmpus II, Avenida Mangará, 447, Jardim Mangará, 15775-000 Santa Fé do Sul – SP, Brasil, e-mail: luan.toro@unesp.br

Recebido: Fevereiro 25, 2023

Aprovado: Março 20, 2023