

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia



Dissertação

**Tratamento da Periodontite Experimental em Ratos com Clorexidina como
Adjuvante à Terapia Periodontal Não-Cirúrgica**

Núbia Rosa Prietto

Pelotas, 2017

Núbia Rosa Prietto

**Tratamento da Periodontite Experimental em Ratos com Clorexidina como
Adjuvante à Terapia Periodontal Não-Cirúrgica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Marchi Martins

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P949t Prietto, Núbia Rosa

Tratamento da periodontite experimental em ratos com clorexidina como adjuvante à terapia periodontal não-cirúrgica / Núbia Rosa Prietto ; Fábio Renato Manzolli Leite, orientador ; Thiago Marchi Martins, coorientador. — Pelotas, 2017.

38 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Clorexidina. 2. Doença periodontal. 3. Periodontite. 4. Rato. 5. Tratamento periodontal. I. Leite, Fábio Renato Manzolli, orient. II. Martins, Thiago Marchi, coorient. III. Título.

Black : D64

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

Núbia Rosa Prietto

Tratamento da Periodontite Experimental em Ratos com Clorexidina como Adjuvante
à Terapia Periodontal Não-Cirúrgica

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite (Orientador)

Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araraquara-SP, Brasil.

Profa. Dra. Natália Marcumini Pola, Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP/Araçatuba-SP, Brasil

Profa. Dra. Patrícia Daniela Melchiors Angst, Doutor em Odontologia, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Prof. Dr. Gustavo Giacomelli Nascimento (suplente), Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Prof. Dr. Luis Eduardo Rilling da Nova Cruz (suplente), Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus professores que foram essenciais nesse processo de realização de mais um sonho.

Agradecimentos

A Deus, pois a Ele recorri em muitos momentos de fraqueza e insegurança, encontrando forças para superar meus próprios limites e seguir em frente.

Aos meus pais, Renato e Elaine (*in memoriam*), por sempre oferecerem confiança, apoio e incentivo às minhas escolhas, acreditando na minha capacidade. Que sempre me encorajaram a enfrentar obstáculos e acreditar em meus sonhos. Tudo o que sou hoje, devo a vocês. Minhas conquistas também são suas.

Aos meus amigos, pela amizade verdadeira e por compreenderem minhas ausências e ansiedades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Leite, que acreditou em minha capacidade, transmitindo conhecimento sempre com muita paciência. Meu respeito e admiração.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Martins, pela sua dedicação profissional, competência e atenção. Meu reconhecimento.

À banca por aceitar nosso convite e auxiliar a melhorar este trabalho. Meu reconhecimento e admiração.

Aos demais professores, que fizeram parte dessa trajetória, foram essenciais durante o mestrado. Meu respeito e admiração.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas por possibilitar a realização deste sonho.

A todos que de alguma forma participaram dessa conquista.

Obrigada.

Notas Preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: 09/01/2017.

O projeto de pesquisa contido nesta dissertação é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 03 de setembro de 2015 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores: Fábio Renato Manzolli Leite (Orientador), doutor em odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Natália Marcumini Pola, doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Patrícia Daniela Melchioris Angst, Doutora em Odontologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo

PRIETTO, Núbia Rosa. **Tratamento da Periodontite Experimental em Ratos com Clorexidina como Adjuvante à Terapia Periodontal Não-cirúrgica**. 2017. 38p. Dissertação de mestrado em Odontologia – Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Evidências científicas apontam que os microorganismos presentes nos biofilmes subgengivais podem causar danos diretos e indiretos ao periodonto. O dano indireto pode ser ocasionado pela ativação das respostas imunoinflamatórias do hospedeiro, e, de forma geral, é o principal responsável pela degeneração dos tecidos periodontais. O tratamento da periodontite é baseado na remoção de microbiota subgengival patogênica, por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR). No entanto, fatores sistêmicos e locais, como áreas de difícil acesso aos instrumentos periodontais, podem comprometer a eficácia do tratamento periodontal. Intervenções terapêuticas associando diferentes fármacos ao tratamento com RAR têm sido pesquisadas. Assim, este estudo avalia os efeitos da irrigação subgengival utilizando clorexidina (RAR) 0,12% e 0,2% como adjuvante ao tratamento mecânico da periodontite induzida por ligadura de algodão em ratos. A periodontite foi induzida por ligadura de algodão amarrada subgengivalmente ao redor do primeiro molar inferior esquerdo em noventa ratos. A ligadura foi removida após sete dias e os animais foram distribuídos nos grupos: 1) grupo RAR, raspagem e alisamento radicular (RAR) e irrigação subgengival com solução salina a 0,9% (n = 30); 2) grupo RAR + 0,12% CHX, RAR e irrigação com CHX a 0,12% (n = 30); 3) RAR + grupo CHX a 0,2%, RAR e irrigação com CHX a 0,2% (n = 30). Dez animais de cada grupo foram sacrificados aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento. A região de furca foi analisada histometricamente para determinar a área de perda óssea. Os dados foram analisados com a análise de variância unidirecional de Kruskal-Wallis (ANOVA) seguida pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). Ambos os grupos de clorexidina apresentaram menor inflamação e melhor reparação tecidual ao longo do experimento quando comparados com o grupo RAR. Na análise histométrica aos 7, 15 e 30 dias, o grupo RAR ($4,58 \pm 2,51 \text{ mm}^2$, $4,21 \pm 1,25 \text{ mm}^2$, $3,49 \pm 1,48 \text{ mm}^2$) apresentou maior perda óssea ($p > 0,05$) do que os grupos RAR + 0,12% CHX ($1,86 \pm 1,11 \text{ mm}^2$, $0,79 \pm 0,27 \text{ mm}^2$, $0,34 \pm 0,14 \text{ mm}^2$) e RAR + 0,2% CHX ($1,14 \pm 0,51 \text{ mm}^2$, $0,98 \pm 0,40 \text{ mm}^2$, $0,41 \pm 0,21 \text{ mm}^2$), respectivamente. A irrigação subgengival com clorexidina parece apresentar propriedades antiinflamatórias com características histoprotetoras durante o tratamento da periodontite.

Palavras-chave: clorexidina; doença periodontal; periodontite; rato; tratamento periodontal.

Abstract

PRIETTO, Núbia Rosa. **Treatment of Experimental Periodontitis in Rats with Chlorhexidine as Adjuvant to the Basic Periodontal Therapy**. 2017. 38p.

Dissertation (Master degree in Prosthodontics). Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Periodontitis is caused by subgingival bacterial communities with virulence potential. These bacteria cause tissue rupture and/or trigger destructive immunopathological responses of the host which, in turn, lead to the destruction of the supporting periodontal tissue and may cause eventual loss of teeth. Scientific evidence indicates that microorganisms present in subgingival biofilms can cause direct and indirect damage to the periodontium. The indirect damage can be caused by the activation of host immune responses that result in the degeneration of the periodontal tissues. The treatment of periodontitis is based on the removal of pathogenic subgingival microbiota by scaling and root planing (RAR). However, systemic and local factors, such as areas of difficult access to periodontal instruments, may compromise the effectiveness of periodontal treatment. Therapeutic interventions involving different drugs to RAR treatment have been investigated. This study evaluates the effects of subgingival irrigation using 0.12% or 0.2% chlorhexidine (CHX) as adjuvant to mechanical treatment of periodontitis induced in rats. Periodontitis was induced by means of a cotton ligature tied subgingivally around the first lower left molar in ninety rats. The ligature was removed after seven days and the animals were divided into the following groups: 1) RAR group, scaling and root planing (RAR) and subgingival irrigation with 0.9% saline solution ($n = 30$); 2) RAR + 0.12% CHX, RAR group and irrigation with 0.12% CHX ($n = 30$); 3) RAR + 0.2% CHX group, RAR and irrigation with 0.2% CHX ($n = 30$). Ten animals from each group were sacrificed at 7, 15 and 30 days after treatment. The furcation region was analyzed histometrically to determine the area of bone loss. Data were analyzed using Kruskal-Wallis univariate analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunn test ($p < 0.05$). Both groups of chlorhexidine presented lower inflammation and better tissue repair throughout the experiment when compared with the RAR group. In the histometric analysis at 7, 15 and 30 days, the RAR group ($4.58 \pm 2.51 \text{ mm}^2$, $4.21 \pm 1.25 \text{ mm}^2$, $3.49 \pm 1.48 \text{ mm}^2$) presented greater bone loss ($p > 0.05$) than the RAR + 0.12% CHX groups ($1.86 \pm 1.11 \text{ mm}^2$, $0.79 \pm 0.27 \text{ mm}^2$, $0.34 \pm 0.14 \text{ mm}^2$) and RAR + 0.2% CHX ($1.14 \pm 0.51 \text{ mm}^2$, $0.98 \pm 0.40 \text{ mm}^2$, $0.41 \pm 0.21 \text{ mm}^2$), respectively. Subgingival irrigation with chlorhexidine appears to have anti-inflammatory properties with histoprotective characteristics during the treatment of periodontitis.

Keywords: chlorhexidine; periodontal disease; periodontitis; rat; periodontal treatment.

Lista de figuras

Figura 1	Fotografia do processo de indução da doença periodontal experimental no primeiro molar inferior esquerdo.	17
Figura 2	Ilustração esquemática da área de furca a ser analisada	20
Figura 3	Ilustração esquemática da delimitação da área óssea perdida a ser analisada dentro da área de interesse	20
Figura 4	Fotomicrografia ilustrando o septo ósseo na região de furca da periodontite induzida por ligadura no primeiro molar inferior.	27

Lista de tabelas

Tabela 1 Perda óssea em mm² (média ± DP) na área de furca, 28
segundo grupos e períodos experimentais (n = 10/ grupo)

Sumário

1 Introdução	13
1.1 Revisão de literatura.....	13
1.2 Objetivos	18
1.3 Materiais e métodos	18
2 Capítulo 1: Treatment of Experimental Periodontitis With Chlorhexidine as Adjuvant to Scaling and Root Planing (RAR).....	22
3 Considerações finais	32
Referências	33
Anexos	37

1 Introdução

1.1 Revisão de literatura

A periodontite é uma doença inflamatória, iniciada principalmente por patógenos bacterianos e seus subprodutos. No entanto, a destruição tecidual ocorre devido à resposta imunoinflamatória do hospedeiro, desencadeada por esses patógenos e seus fatores de virulência (GENDRON et. al., 1999). Os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas e ácidos lipoteicóicos (LTA), lipopeptídeos e peptidoglicanos (PG) de bactérias gram-positivas são capazes de induzir a ativação de células do sistema imunológico, causando a inflamação. A liberação desses componentes é feita pelas moléculas de defesa naturais do corpo ou pela ação de antibióticos. Após o reconhecimento dos componentes de parede celular, as células de vigilância imunológica produzem mediadores inflamatórios. Terapias capazes de sequestrar o LPS ou o LTA podem evitar a resposta excessiva do sistema imune inato. O uso de agentes antimicrobianos capazes de prevenir a superprodução não regulada de mediadores inflamatórios por bactérias patogênicas e capazes direcionar LPS e LTA, pode ser uma abordagem adequada (ZORKO, JERALA, 2008).

Baseado no fato de que está claramente demonstrado que a periodontite é uma doença infecciosa, o conceito atual para o tratamento periodontal consiste principalmente na eliminação da infecção por meio da raspagem e alisamento radicular (ALMEIDA et. al., 2015). Por outro lado, esta terapia pode ser frequentemente desafiada, tanto por fatores sistêmicos, quanto por fatores locais que devido à morfologia radicular complexa e desfavorável, como áreas de furca e depressões radiculares, especialmente nos locais de bolsas periodontais profundas que podem ser áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, portanto prejudicando o reparo periodontal, desencadeando a necessidade de intervenções terapêuticas adjuvantes ao tratamento básico (ALMEIDA et. al., 2015).

Nestes casos, vários estudos têm demonstrado a presença de remanescentes de *Tannerella forsythia* e principalmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em bolsas periodontais após a terapia periodontal não-cirúrgica (FERNANDES et al., 2010).

A administração local de agentes antimicrobianos dentro de bolsas periodontais emergiu como um fator adjuvante aos tratamentos convencionais que não proporcionaram remissão da doença com o tratamento inicial. Um dos sistemas de administração local de agentes antimicrobianos é a irrigação subgengival. A utilização desses adjuvantes no tratamento periodontal visou diminuir ou eliminar microrganismos que continuavam viáveis favorecendo a progressão da periodontite (FERNANDES et al., 2010). Uma propriedade relevante para um agente antimicrobiano ser eficaz quando utilizada por meio de administração local é a substantividade (FERNANDES et al., 2010).

Diferentes agentes farmacológicos têm sido estudados para o uso sistêmico e tópico, tem sido abordado se o uso dessas substâncias afeta a atividade dos osteoclastos, células responsáveis pela degeneração do osso alveolar na periodontite. Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo. Atualmente, os osteócitos são conhecidos como reguladores da atividade esquelética, detectam e integram sinais mecânicos e químicos necessários para regular as células ósseas efetoras, os osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos se comunicam diretamente e indiretamente com os osteoblastos e são capazes de estimular ou inibir a atividade de tais células. A osteoclastogênese e a atividade dos osteoclastos são também reguladas pelos osteócitos (FERNANDES et al., 2010).

Outras abordagens visam estabelecer a função dos diferentes tipos celulares na doença periodontal, evidências apontam que receptor ativador do ligante fator nuclear- κ B (RANKL) / RANK / sistema osteoprotegerina (OPG) tem papel relevante na regulação da reabsorção óssea, podendo identificar os fatores que regulam a função celular. RANKL / RANK sinaliza para regular a formação de osteoclastos multinucleados partir de seus precursores, bem como sua ativação e sobrevivência na remodelação óssea normal e em uma variedade de condições patológicas. OPG protege o esqueleto da reabsorção óssea excessiva, ligando-se a RANKL e evitando que ele se ligue ao seu receptor RANK. Assim, a razão RANKL / OPG é um importante determinante da massa óssea e da integridade do esqueleto e consequentemente na reabsorção óssea observada na periodontite. O equilíbrio entre os níveis de expressão do ativador de receptor do ligando B de F de tipo nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) são cruciais para a diferenciação e atividade dos osteoclastos e tem sido implicado na progressão da perda óssea na periodontite. Estudos estimulando endotoxinas de microrganismos envolvidos na

periodontite, mostraram a ativação RANKL / RANK causando reabsorção óssea (LEITE et al., 2014).

Além disso, os componentes da matriz extracelular, por exemplo, colágeno, fibronectina e proteoglicanas são os principais protetores dos tecidos periodontais, responsáveis por manter a integridade estrutural do aparelho de ancoragem dos dentes (ALMEIDA et. al., 2015). A degradação desses componentes da matriz extracelular causa perda irreversível de tecido conjuntivo e osso alveolar podendo levar a perda dentária com sequelas estéticas, funcionais e comprometimento da qualidade de vida (ALMEIDA et. al., 2015).

Existe um conjunto crescente de evidências que sugerem que uma família de enzimas proteolíticas derivadas dos hospedeiros, chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), desempenham um importante papel no processo de desenvolvimento da doença inflamatória e destruição decorrente da periodontite (TÜTER et al., 2002). A relação entre a sua atividade e inibição influencia o resultado de cicatrização. Diferentes abordagens para modular a resposta inflamatória do hospedeiro têm sugerido a indução da regeneração periodontal mais equilibrada. A ideia é inibir as vias inflamatórias que conduzem à degradação dos tecidos e desencadeiam a proliferação e diferenciação celular (GOKHALE, PADHYE, 2013). Estudos sugerem que a clorexidina (CHX) tem inibição direta sobre a atividade das MMPs, representando um efeito valioso deste agente antimicrobiano no tratamento da periodontite (GENDRON et. al., 1999).

A CHX numa concentração de 0,03%, apresentou capacidade de inibição completa das atividades de duas metaloproteinases, MMP-2 e -9. Além disso, foi observado que o efeito inibitório da CHX é dependente da concentração. A concentração mínima de CHX que conduziu a uma inibição completa da atividade de MMP-9 foi de 0,002%, enquanto a que a atividade da MMP-2 foi inibida numa concentração de CHX mais baixa 0,0001(GENDRON et. al., 1999). Estudos apontam que os vários tipos de MMPs foram encontradas, em níveis elevados e nas suas formas ativas, no fluído crevicular e nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite. Tais observações apontam a importância das MMPs como mediadores derivados da célula hospedeira na destruição tecidual observada durante a periodontite (GENDRON et. al., 1999).

As principais fontes celulares de MMP-2 e 9 incluem fibroblastos presentes no ligamento gengival e periodontal, bem como células endoteliais e epiteliais. Além

disso, a MMP-9 presente na inflamação periodontal pode originar-se de neutrófilos, que são também importantes fontes de MMP-8. Estes estudos também demonstraram que células não polimorfonucleares, como fibroblastos gengivais e periodontais e células endoteliais, podem expressar MMP-8. Dessa forma, as MMPs podem ser originadas a partir de múltiplas fontes celulares e inflamatórias. (GENDRON, et al., 1999). O papel dos fármacos anti-inflamatórios na patogênese da doença periodontal destrutiva está associado à inibição das metaloproteinases e à redução da expressão das prostaglandinas, agindo na via da cicloxigenase (GARCIA et al., 2010).

A cicloxigenase é uma enzima crítica na formação da prostaglandina E₂ a partir do ácido araquidônico. Os metabolitos do ácido araquidônico, principalmente prostaglandinas da série E (PGE₂), parecem ser mediadores críticos na progressão da doença periodontal. A prostaglandina E₂, produzida por macrófagos e fibroblastos ativados, é considerada o principal mediador inflamatório da destruição óssea alveolar (GARCIA et al., 2010).

Alguns estudos em animais demonstraram que o inibidor da COX-2 promove menos degradação periodontal (GARCIA et al., 2010).

Assim, a inibição da MMP seria importante após o tratamento periodontal. Com base em diversos estudos, os inibidores de MMP têm sido investigados como uma classe de potenciais agentes terapêuticos no tratamento da periodontite, como por exemplo, as tetraciclinas, os bifosfonatos e a clorexidina que mostraram inibir a atividade de várias MMPs (ALMEIDA et al., 2015).

A clorexidina, uma bisbiguanida catiônica, é um antisséptico que surgiu na década de 40, mas somente nos anos 50 foi introduzida no mercado para antissepsia de ferimentos na pele e na odontologia, atualmente é considerado padrão-ouro no controle químico de placa bacteriana (COUSIDO et al., 2010).

A clorexidina (CHX) é um agente com atividade antimicrobiana de largo espectro, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (COUSIDO et al., 2010).

Embora, a CHX seja utilizada há mais de 50 anos, há poucos relatos de resistência bacteriana o que comumente ocorre com administração de antibióticos sistêmicos, dependendo das doses aplicadas, podem aumentar a resistência bacteriana ou interagir com outros fármacos e causar vários efeitos colaterais (ZORKO, JERALA, 2008).

A CHX demonstrou potencial de se ligar com a LPS e LTA usando vários métodos biofísicos. Além disso, também evidenciou neutralizar a ativação dos macrófagos por bactérias gram-negativas e gram-positivas mortas por antibióticos ou resultantes da ativação das células mediadas por LPS / LTA (ZORKO, JERALA, 2008).

Esta bisbiguanida catiônica tem um efeito único de inibição da placa dentária, principalmente devido à sua substantividade e sua propriedade antimicrobiana (GRENIER, 1993). A CHX demonstrou ter substantividade em relação ao esmalte e mucosa oral (FERNANDES et al., 2010).

Estudos demonstram que a CHX consiste num adjuvante eficiente para a terapia periodontal controlando a placa supragengival e a inflamação gengival (COUSIDO et al., 2010). Outros estudos confirmaram que a irrigação subgengival com CHX reduz a inflamação periodontal, o sangramento, a profundidade da bolsa periodontal e a placa subgengival (ZORKO, JERALA, 2008). Consequentemente, os enxaguatórios bucais de CHX são amplamente utilizados na profilaxia e tratamento de doenças periodontais (GENDRON, et al., 1999).

Embora tenham sido relatados inúmeros benefícios tanto *in vivo* quanto *in vitro* com o uso da CHX, o seu mecanismo de ação continua a ser pesquisado, uma vez que não foi completamente elucidado, alguns estudos sugerem que a molécula catiônica da clorexidina é rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular, devido a interações eletrostáticas, possivelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio. Em dosagens elevadas a CHX tem ação bactericida, causa a precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas levando a morte celular bacteriana (ZANATTA; RÖSSING, 2007).

A CHX tem demonstrado diminuir significativamente a aderência de *Porphyromonas gingivalis*, apresenta atividade proteolítica sobre certos patógenos periodontais e capacidade antioxidante através da inibição da produção de ânion superóxido nas células vermelhas e brancas do sangue (GLABER et al., 1987). A clorexidina elimina os oxidantes azoto-cloro de longa duração capazes de degradar a grupos sulfidrílo de proteínas ligadas a autoativação endógena da collagenase dos neutrófilos (WEISS, 1989). Devido à função dos neutrófilos na proteção dos tecidos periodontais contra a invasão bacteriana e também na degradação da matriz extracelular, uma substância com capacidade de controlar a proliferação de

bactérias e a atividade da collagenase seria interessante no tratamento da doença periodontal (ALMEIDA et. al., 2015).

1.2 Objetivos

Ponderando a ausência de estudos que avaliem os efeitos da clorexidina no tratamento da periodontite, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da clorexidina como tratamento adjunto ao mecânico convencional, em áreas de furca com perda óssea em ratos com periodontite experimental induzida.

1.3 Materiais e métodos

Animais

Este estudo foi conduzido com o uso de 90 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com 2 meses de idade, pesando entre 130 a 160 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram deixados a aclimatar ao ambiente do laboratório durante um período de cinco dias. Todos os protocolos descritos abaixo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFPel (CEEAA 1587).

Protocolo para indução experimental da periodontite

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com uma mistura de cetamina (70 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg). Uma ligadura de algodão #24 (Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) foi amarrado em posição submarginal ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de cada rato para induzir o acúmulo de biofilme e, conseqüentemente, o desenvolvimento da periodontite experimental (JOHNSON, 1975; FERNANDES et. al., 2010) (figura 1) expõe como ocorreu a indução da doença.



Figura 1. Fotografia do processo de indução da doença periodontal experimental no primeiro molar inferior esquerdo.

Raspagem e alisamento radicular

O fio de algodão foi mantido durante sete dias. A raspagem foi realizada por um mesmo operador treinado, utilizando curetas manuais mini-five (Hu-Friedy Co. In., Chicago, IL, EUA) com 10 movimentos de tração disto-mesial sobre as superfícies bucal e lingual dos primeiros molares inferiores esquerdos. As áreas interproximal e de furca foram raspadas utilizando movimentos de tração cervical-oclusal com a mesma cureta (FERNANDES et al., 2009).

Grupos

Os animais foram alocados aleatoriamente por meio de uma tabela, gerada em um computador, em um total de 30 animais por grupo.

Grupo Controle - C (30 animais): raspagem e alisamento periodontal (RAP) + irrigação com 1 mL de solução salina;

Grupo 1 (30 animais): RAP + Irrigação com 1 ml de clorexidina 0,12%;

Grupo 2 (30 animais): RAP + Irrigação com 1 ml de clorexidina 0,20%.

A solução salina 0,9%, e o clorexidina, nas concentrações 0,12% e 0,20% foram depositados na bolsa periodontal lentamente, em um tempo aproximado de 30 segundos, utilizando uma seringa (1 mL) e uma agulha de insulina (13mm x 0,45mm) (Becton Dickinson Ind. Ltd, Curitiba, PR, Brasil), sem bisel.

Dez animais de cada grupo foram sacrificados no 7^o, 15^o e 30^o dia, após o tratamento da doença periodontal, com a administração de uma dose letal de tiopental (150 mg/Kg) (Cristalia, Ltd, Itapira, SP).

Procedimentos laboratoriais

Os espécimes foram desmineralizados em EDTA a 10%, lavados, desidratados em concentrações graduadas de álcool, purificados em xileno e incorporados em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em série em direção méso-distal ao longo do eixo longo dos dentes para gerar seções longitudinais de 5 µm de espessura. Cinco cortes equidistantes de cada amostra foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica e histométrica.

Análise histológica e histométrica

As seções foram coradas por HE e analisadas por microscopia óptica para estabelecer a perda óssea e as características do ligamento periodontal na região de bifurcação nos primeiros molares.

A área de perda de óssea na região de furca foi histometricamente determinada utilizando um sistema de análise de imagens (Image Tool, da Universidade do Texas, San Antonio, TX, EUA). Depois de excluir a primeira e a última seção onde a região de bifurcação era evidente, foram selecionadas cinco seções equidistantes de cada bloco da amostra e capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz. A área foi medida em milímetros quadrados (mm^2) de perda óssea na região de furca e determinada histometricamente, (as figuras 3 e 4 mostram a área a ser analisada e a delimitação esquemática da área óssea perdida a ser analisada, respectivamente). Um examinador cego, previamente treinado, selecionou as seções para análise histométrica e histológica. Outro examinador, mascarado e calibrado, conduziu as análises. Os valores foram calculados e comparados estatisticamente.

A análise histológica seguiu a descrição dos seguintes parâmetros: a natureza e o grau de inflamação, a extensão do processo inflamatório, extensão e natureza de reabsorção óssea, do cemento e da dentina, padrão de estruturação da matriz extracelular periodontal e padrão de celularidade desses tecidos.

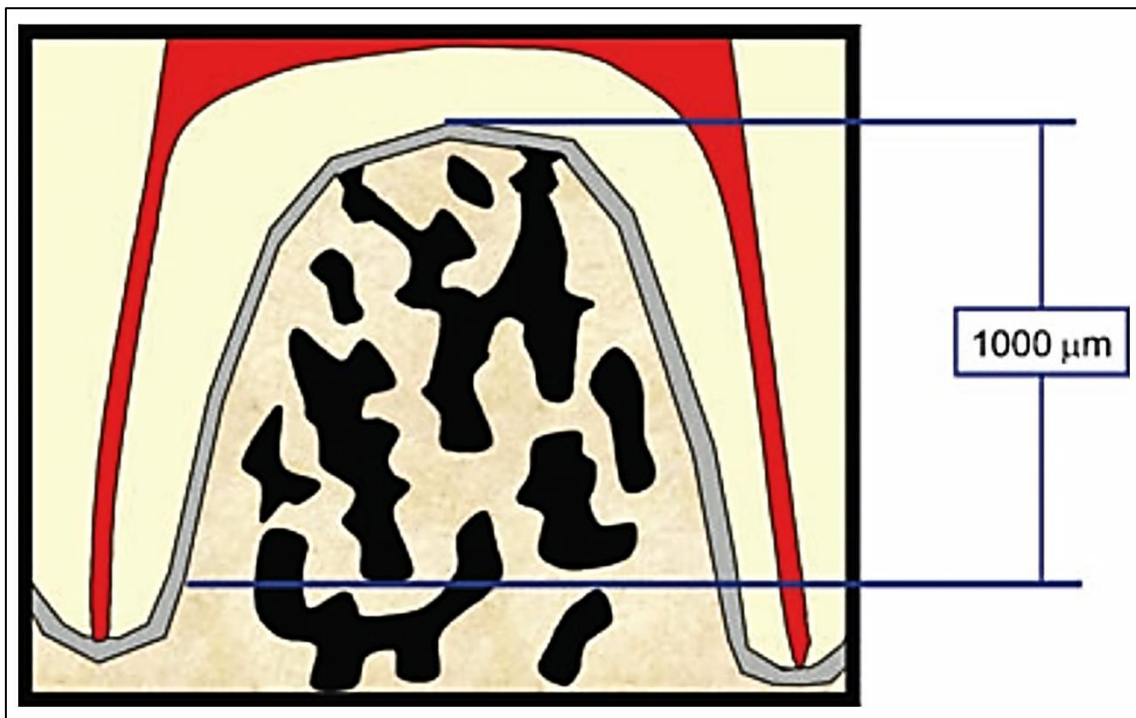


Figura 2: Ilustração esquemática da área de furca a ser analisada (1000µm abaixo do teto da furca delimitado pelas raízes) (CÉSAR-NETO et al., 2006).

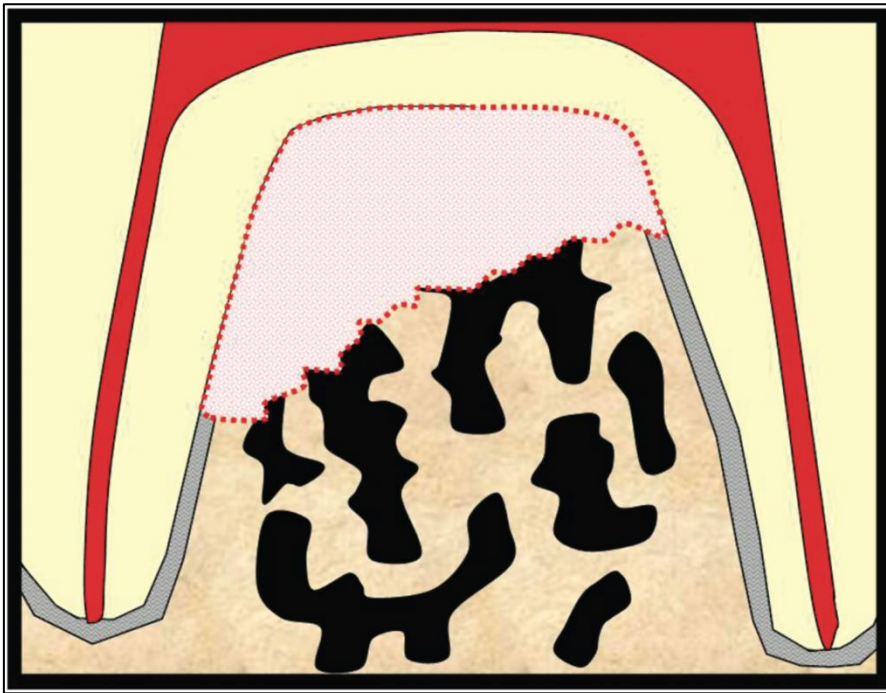


Figura 3: Ilustração esquemática da delimitação da área óssea perdida a ser analisada dentro da área de interesse (NOGUEIRA-FILHO et al., 2007).

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando um software de estatística. A reprodutibilidade intraexaminadores foi verificada com o teste t pareado e o coeficiente de correlação de Pearson antes e durante a análise histométrica usando sete seções de cada grupo, que foram selecionadas aleatoriamente e analisadas duas vezes com um intervalo de uma semana entre as análises. A normalidade dos dados foi analisada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os grupos foram comparados através da análise de variância unidirecional de Kruskal-Wallis (ANOVA). As comparações múltiplas (post hoc) foram realizadas usando o teste de Dunn, e os valores de $P < 0,05$ indicaram significância estatística.

2 Capítulo 1: Treatment of Experimental Periodontitis With Chlorhexidine as Adjuvant to Scaling and Root Planing (RAR)*

Running title: Chlorhexidine as Adjuvant to RAR

Nubia R. Prietto*, DDS, Thiago M. Martins*, DDS, MS, PhD, Carolina S. Santinoni†, DDS, MS, PhD, Edilson Ervolino‡, DDS, MS, PhD, Fábio R. M. Leite*, DDS, MS, PhD

*Post-graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

† School of Dentistry, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

‡ Department of Basic Sciences, Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, São Paulo, Brazil

KEY WORDS: Periodontitis, periodontal diseases, rats, wound healing,

Word count: 2078

Figures: 1

Tables: 1

One-sentence summary: Subgingival irrigation with chlorhexidine seems to be a possible histoprotective agent during the treatment of periodontitis.

Corresponding Author

Fábio R. M. Leite

Universidade Federal de Pelotas

457 Gonçalves Chaves St, 5th floor, room 511

Pelotas, RS, Brazil, ZIP 96015-560

leite.fabio@gmail.com

* Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Periodontology

ABSTRACT

Background: This study assesses the effects of subgingival irrigation with 0.12% and 0.2% chlorhexidine (CHX) as an adjuvant to the mechanical treatment of ligature-induced periodontitis in rats.

Materials and Methods: Periodontitis was ligature-induced around the mandibular left first molar in ninety rats. Ligature was removed after 7 days and the animals were distributed into the groups: 1) RAR group, scaling and root planing (RAR) and subgingival irrigation with 0.9% saline solution (n = 30); 2) RAR + 0.12% CHX group, RAR and irrigation with 0.12% CHX (n = 30); 3) RAR + 0.2% CHX group, RAR and irrigation with 0.2% CHX (n = 30). Ten animals from each group were euthanized at 7, 15, and 30 days after treatment. Furcation region was histometrically analyzed to determine the bone loss area. Data was analyzed with Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's test.

Results: Both chlorhexidine groups presented less inflammation and improved tissue repair along the entire experiment when compared with the RAR group. In the histometric analysis at 7, 15 and 30 days, RAR group ($4.58 \pm 2.51 \text{ mm}^2$, $4.21 \pm 1.25 \text{ mm}^2$, $3.49 \pm 1.48 \text{ mm}^2$), showed statistically more bone loss ($p > 0.05$) than groups RAR + 0.12% CHX ($1.86 \pm 1.11 \text{ mm}^2$; $0.79 \pm 0.27 \text{ mm}^2$; $0.34 \pm 0.14 \text{ mm}^2$) and RAR + 0.2% CHX ($1.14 \pm 0.51 \text{ mm}^2$; $0.98 \pm 0.40 \text{ mm}^2$; $0.41 \pm 0.21 \text{ mm}^2$), respectively.

Conclusions: Subgingival irrigation with chlorhexidine seems to present an anti-inflammatory property with histoprotective characteristics during the treatment of periodontitis.

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory condition mainly initiated by bacteria which gradually leads to destruction of the supportive tissues of teeth. Conversely, the host inflammatory response triggered by bacteria compounds is the major responsible for the tissue destruction.¹ Extracellular matrix components, e.g. collagen, fibronectin, and proteoglycans, maintain the structural integrity of the anchoring apparatus. Extracellular matrix components degradation causes irreversible loss of connective tissue and alveolar bone.² Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of proteolytic enzymes, are strategic regulators of the healing process.³ The ratio between their activity and inhibition influences the healing outcome.³ Different approaches to modulate host inflammatory response have been suggested to induce a more

balanced periodontal regeneration. The idea is to inhibit inflammatory pathways leading to tissue breakdown and to trigger those associated with cell proliferation and differentiation.⁴ Therefore, MMP inhibition would be appreciated after periodontal treatment. Tetracyclines, bisphosphonates and chlorhexidine have been shown to inhibit the activity of several MMPs.⁵⁻⁷

Chlorhexidine (CHX) is an antimicrobial agent with broad spectrum antimicrobial activity. This cationic bis-biguanide reduces dental biofilm proliferation, therefore its use in subgingival irrigation decreases bleeding and periodontal pocket depth. CHX presents proteolytic activity of certain periodontal pathogens⁸ and antioxidative capacity⁹ through inhibition of superoxide anion generation in red and white blood cells.^{10, 11} Chlorhexidine scavenge long-lived nitrogen-chlorine oxidants capable of degrading protein sulfhydryl groups linked to endogenous autoactivation of neutrophil collagenase.^{12, 13} Due to the role of neutrophils in the protection of periodontal tissues against bacteria invasion but also in the degradation of the extracellular matrix, a substance that controls bacteria proliferation and collagenase activity would be interesting.

Pondering the absence of studies that evaluate the effects of chlorhexidine on periodontitis healing, the purpose of this study was to compare the efficacy chlorhexidine plus conventional mechanical scaling root planing (RAR) on alveolar bone loss in furcation areas of experimental periodontitis induced in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ninety 2-month-old rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) weighing 130 to 160 g were used. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (protocol 1587) of the Federal University of Pelotas. Animals were divided into three groups (n = 30) according to the following protocol: 1) scaling root planing - RAR (control) subjected to experimental periodontitis (EP) induction, RAR and irrigation with 1 mL of 0.9% saline solution; 2) RAR + 0.12% CHX, subjected to EP induction, RAR and irrigation with 1 mL 0.12% chlorhexidine solution*; and 3) RAR + 0.2% CHX, RAR after EP induction and irrigation with 1 mL 0.2% chlorhexidine solution*.

* Maquira Produtos Odontológicos, Maringa, Paraná, Brazil

Experimental periodontitis induction (EP)

Animals were anesthetized by intramuscular injection with a mixture of ketamine (70 mg/kg)[†] and xylazine (6 mg/kg)[‡]. A cotton thread[§] was tied around the mandibular left first molar of each rat to induce biofilm accumulation and, consequently, periodontitis.¹⁴ The ligature was maintained for 7 days. RAR was performed by the same trained operator using 10 distal–medial traction movements of a curette^{**} over the buccal and lingual surfaces of the treated area. The interproximal and furcation areas were scraped using cervical–occlusal traction movements of the same curette. At 7, 15, or 30 days after ligature removal the animals were euthanized with an overdose of thiopental (150 mg/kg)^{††}. Mandibles were dissected and fixed in 4% formaldehyde for 48h.

Histologic Processing

Specimens were demineralized in 10% EDTA, washed, dehydrated in graded alcohol concentrations, cleared in xylene, and embedded in paraffin. The paraffin blocks were serially cut in a mesio-distal direction along the long axis of the teeth to generate 5 µm-thick longitudinal sections. Five equidistant sections from each specimen were stained with hematoxylin and eosin (HE) for histologic and histometric analysis.

Histological and Histometric Analysis

Sections dyed by H&E were analyzed under light microscopy to establish the bone loss and characteristics of periodontal ligament in the furcation region of first molars. The area of bone loss in the furcation region was histometrically determined using an image analysis system^{‡‡} as previously described.¹⁴ After excluding the first and last sections where the furcation region was evident, 5 equidistant sections of each specimen block were selected and captured by a digital camera coupled to a light microscope. The area (mm²) of bone loss in the furcation region was determined histometrically.¹⁴ One blinded, trained examiner selected the sections for

[†] Vetaset, Zoetis, Florham Park, NJ

[‡] Coopazine, Coopers, São Paulo, São Paulo, Brazil

[§] Corrente Algodão 24, Coats Corrente, São Paulo, São Paulo, Brazil

^{**} 1-2 Mini Five curette, Hu-Friedy, Chicago, IL

^{††} Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil

^{‡‡} ImageJ Tool, San Antonio, TX, USA

the histometric and histological analysis. Another masked, calibrated examiner conducted the histometric analysis.

Statistical Analyses

Data were analyzed using a statistics software^{§§}. Intra-examiner reproducibility was checked with paired t-test and Pearson's correlation coefficient before and during the histometric analysis. Seven sections from each group were selected at random and analyzed twice with a 1-week interval between analyses. Data normality was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Groups were compared via Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons (post hoc) were performed using Dunn's test, and P values <.05 indicated statistical significance.

RESULTS

Histologic analyses

In the RAR group (control) a large number of neutrophils occupied the connective tissue at the furcation area at 7 days after treatment. The area around bone septum presented less acute inflammatory infiltrate (Fig. 1A). The bone consisted of thin and irregular trabeculae with resorption lacunae and active osteoclasts. At 15 days after RAR, the acute inflammatory infiltrate reduced but was still more evident than chronic inflammatory cells, e.g. macrophages and lymphocytes. Connective tissue was disorganized with small number of fibroblasts and high number of neutrophils in degeneration. At 30 days after RAR a chronic inflammatory infiltrate was still present. Connective tissue occupied a large portion of the furcation area (Fig. 1D). Inflammatory cells were located closer to the septum bone, which showed more regular outline. The cementum still showed small areas of resorption with most of them inactive. Cellular cement was deposited in some areas closer to the remaining septum.

In both RAR plus chlorhexidine groups, the acute inflammatory infiltrate was moderate to discrete at 7 days after RAR plus subgingival irrigation (Fig. 1B and 1C). It consisted of a mix of acute and chronic inflammatory cells in an advanced under organization connective tissue. The bone septum presented a regular outline with some osteoclasts. Cementum resorption areas were observed in most specimens. At 15 and 30 days after treatments the inflammatory infiltrate was absent in most of the specimens or very few inflammatory cells were observed in a completely organized

^{§§} StataSE 14.1, StataCorp, College Station, TX, USA

connective tissue. Interradicular septum was regular and covered with osteoblasts, osteocytes were abundant and osteoclasts rarely observed. Periodontal ligament was rich in vessels and collagen fibers. All cementum resorption areas were inactive and undergoing repair or had already been replaced by cellular cement. No visual differences were observed between both concentrations of chlorhexidine (Fig. 1E and Fig. 1F).

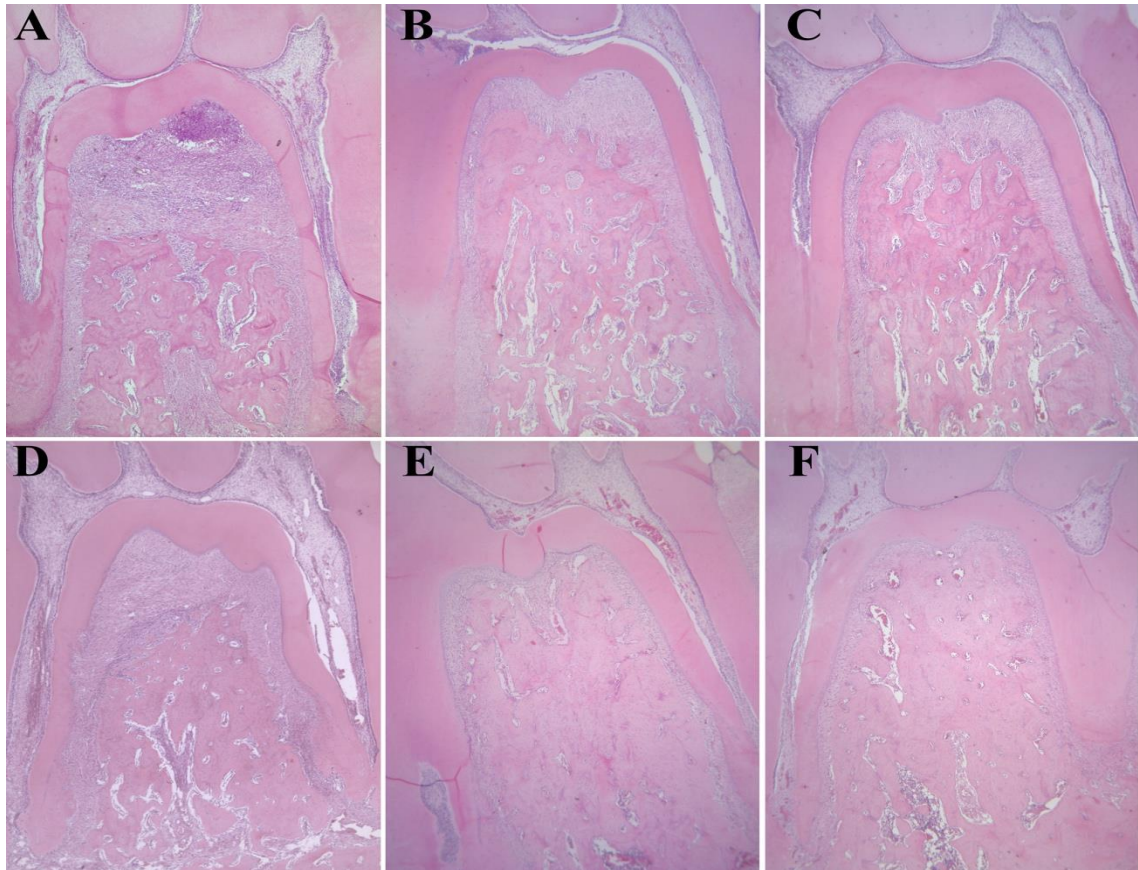


Figure 1. Photomicrograph illustrating the bone septum in the furcation region of ligature-induced periodontitis in the mandibular first molar. A Group RAR, 7 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE); B Group RAR + 0.12% CHX, 7 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE); C Group RAR + 0.2% CHX, 7 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE); D Group RAR, 30 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE); E Group RAR + 0.12% CHX, 30 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE); F Group RAR + 0.2% CHX, 30 days after the periodontal treatment ($\times 12.5$; HE).

Histometric Analyses of Lose Bone in the Furcation of Teeth (PBF)

Paired t-test statistics was calculated, and no differences were observed in the mean values for comparison ($p > 0.05$). In addition, the Pearson's correlation coefficient revealed high correlation (0.89) between the two measurements for the histometric analyses. In the intergroup analysis, the animals in the RAR group showed a lower area of bone than the animals in both chlorhexidine groups for all experimental periods ($P < 0.05$). The animals in the RAR + 0.12% CHX and in the

RAR + 0.2% CHX groups showed similar bone area at 7, 15 and 30 days ($P > 0.05$). In the intragroup analysis, the animals in the RAR group showed a similar area of bone at 7, 15 and 30 days ($P > 0.05$). The animals in the RAR + 0.12% CHX and RAR + 0.2% CHX groups showed a higher area of bone in each period, with a significant difference ($P > 0.05$) specially when the 7 days' period was compared with the 30 days' period. Results are summarized in Table 1.

Table 1. Bone loss in mm² (mean $\pm$ SD) in the furcation area according to groups and experimental periods (n=10/group)

	7 days	15 days	30 days
RAR	4.58 $\pm$ 2.51*‡	4.21 $\pm$ 1.25*‡	3.49 $\pm$ 1.48*‡
RAR + 0.12% CHX	1.86 $\pm$ 1.11†‡	0.79 $\pm$ 0.27†‡	0.34 $\pm$ 0.14†§
RAR + 0.2% CHX	1.14 $\pm$ 0.51†‡	0.98 $\pm$ 0.40†‡§	0.41 $\pm$ 0.21†§

*†Statistically significant difference between groups in the same experimental period.

‡§Statistically significant difference between experimental periods in the same group.

Groups or periods with the same symbol means no statistical differences ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Destructive forms of periodontal inflammation might lead to destruction of extracellular matrix. The major destruction observed in this process is host immune system-mediated but usually initiated by bacteria and their toxic byproducts. Commercially, chlorhexidine is found at high doses (0.12–2.0%) to obtain bactericidal effects.¹⁵ However, low and non-toxic concentrations of chlorhexidine up to 0.05% might modulate the immune response by acting on neutrophils activity.^{10, 16}

Even though neutrophils are recruited to periodontal tissues to have a protective role, they possess a high potential to damage the tissue. After reaching the site, enzymes and reactive oxygen species (ROS) are released by neutrophils in an attempt to deactivate inflammatory triggers.¹⁷ However, neutrophils release proteases, cytokines and myeloperoxidase (MPO), increasing oxidant release and inactivating protective antiproteases.^{16, 17} The superoxide anions are quickly converted to hydrogen peroxide, which is transformed into hypochlorous acid (HOCl) by MPO.¹⁷ Thus, the observed damage to periodontal tissues is mainly caused by

HOCl by increasing cell oxidative stress and by increase of elastase-mediated breakdown of connective tissue components, e.g. elastin, collagen, fibronectin and laminin. Control of neutrophil-mediated proteolysis is one of the key points in pharmacology to reduce inflammatory tissue injury. In this study, CHX seemed to reduce the number of inflammatory cells to the furcation area and promote a more balanced, organized and quicker repair of bone septum and periodontal ligament. We suppose that the higher percentage of bone in both chlorhexidine groups was due to the reaction of CHX with HOCl faster than HOCl-induced inactivation of inhibitors of neutrophil elastases as previously described.¹⁶

The potential to neutralize the inflammation by CHX seems to be dependent on its cation-chelating properties.⁷ Also, CHX quickly deactivate large and small portions of lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) from oral bacteria, preventing further perpetuation of inflammatory cell activation.¹⁸ The capability of CHX to neutralize LPS and LTA before the stimulation of the innate immune response is important since biofilm disruption by mechanical periodontal treatment causes the release of high levels of immunostimulatory bacterial cell wall components, which might exacerbate and/or perpetuate periodontal inflammation and destruction.^{19, 20} CHX inhibits the cell activation by LPS and LTA in a concentration-dependent manner with almost complete inhibition at a concentration of 0.0005% and 0.0001%, respectively. These data might explain the lack of differences in tissue repair between the RAR + 0.12% CHX and the RAR + 0.2% CHX groups. CHX concentrations above 0.05%^{10, 16} might not lead to an extra modulation of the immune response.

In sum, the best results observed in CHX groups might be due to the inhibition of inflammatory cells to release cytotoxic contents and enzymes causing periodontal tissue breakdown and also, by CHX ability to remove remaining of LPS and LTA, which could sustain the excessive inflammatory process observed in the RAR only group.

CONCLUSIONS

Respecting the limitations of this study, the present data showed that chlorhexidine should not be considered only as an antimicrobial agent in subgingival irrigation, but also as an important anti-inflammatory agent. Subgingival irrigation with

CHX seems to be a possible histoprotective agent during the treatment of periodontitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors state that there are no potential conflicts of interest. The study was supported by the FAPERGS (the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul) grant call 02/2013 ARD.

REFERENCES

1. Nicu EA, Loos BG. Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. *Periodontol 2000* 2016;71:140-163.
2. Kornman KS, Page R.C., Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997;14:112-143.
3. Tüter G, Kurtis B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol* 2002;73:487-493.
4. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J* 2013;214:467-471.
5. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
6. Teronen O, Konttinen YT, Lindqvist C, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (clodronate). *Calcif Tissue Int* 1997;61:59-61.
7. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:437-439.
8. Grenier D. Reduction of proteolytic degradation by chlorhexidine. *J Dent Res* 1993;72:630-633.

9. Firatli E, Unal T, Onan U, Sandalli P. Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1994;21:680-683.
10. Goultschin J, Levy H. Inhibition of superoxide generation by human polymorphonuclear leukocytes with chlorhexidine. Its possible relation to periodontal disease. *J Periodontol* 1986;57:422-425.
11. Gabler WL, Bullock WW, Creamer HR. The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. *J Periodontal Res* 1987;22:445-450.
12. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
13. Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 1985;227:747-749.
14. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, et al. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol* 2015;86:1166-1175.
15. Matthews D. No difference between 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinse on reduction of gingivitis. *Evid Based Dent* 2011;12:8-9.
16. Montecucco F, Bertolotto M, Ottonello L, et al. Chlorhexidine prevents hypochlorous acid-induced inactivation of alpha1-antitrypsin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:e72-77.
17. Test ST, Weiss SJ. The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. *Adv Free Radic Biol Med* 1986;2:91-116.
18. Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod* 2015;41:817-823.
19. Leite FRM, Aquino SGd, Guimarães MR, Cirelli JA, Junior CR. RANKL expression is differentially modulated by TLR2 and TLR4 signaling in fibroblasts and osteoblasts. *Immunol Innovation* 2014;2.
20. Leite FRM, de Aquino SG, Guimarães MR, et al. Relevance of the Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and Nod Expressions Induced by TLR and IL-1R Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. *Inflammation* 2014;1-8.

3 Considerações finais

Estudos com ratos apresentam evidências confiáveis e têm sido amplamente utilizados para avaliar a doença periodontal, pois mostram uma resposta biológica muito semelhante à dos humanos. Além disso, o rato é fácil de manusear, tem baixo custo e proporciona um modelo altamente reprodutível para avaliar a progressão e tratamento da periodontite.

Respeitando as limitações deste estudo, os dados demonstraram melhores resultados nos grupos em que a CHX foi utilizada associada a tratamento periodontal não-cirúrgico. Por isso, além do seu uso como agente antimicrobiano na irrigação subgengival, também podemos utilizar a clorexidina como um importante agente antiinflamatório, devido a redução no infiltrado inflamatório. Estes resultados sugerem que benefícios podem ser obtidos a partir do uso clínico da CHX como uma alternativa eficaz e de baixo custo para o tratamento adjuvante da periodontite. A disponibilidade de tipos de terapia adjuvante é importante para o tratamento de áreas periodontais que são difíceis de acessar, incluindo áreas de furca e depressões radiculares. Este trabalho sugere a possibilidade para seu uso em situações que exigem a manutenção ou formação de tecido ósseo, ligamento e cemento, visto que foram observados osteoblastos e osteócitos abundantes e o ligamento rico em vasos e fibras colágenas.

O CHX é um agente valioso para o tratamento de doenças periodontais e pode ser utilizado em outros métodos de liberação. A inibição de MMPs pelo CHX demonstra propriedades antiproteolíticas benéficas que, além das conhecidas propriedades antimicrobianas desta substância.

O tratamento da periodontite associado à irrigação com CHX parece ser um possível agente histoprotetor. Outros estudos devem ser realizados para confirmar esse achado.

Referências

ALMEIDA, J. M. et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, São Paulo, n.11, p.11-18, 2015.

ALMEIDA, R. F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, Portugal, n. 22, p. 379-390, 2006.

BERCHIER, C. E.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, São Paulo, n. 37, p. 829–839, 2010.

CESAR-NETO J.B. et al. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *Journal of Periodontal Research*, n. 41, p. 118–123, 2006.

COUSIDO, M. C. et al. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clinical Oral Investigations*, n. 14, p. 397–402, 2010.

DE ALMEIDA J, et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v.86, p. 1166-1175, 2015.

FERNANDES, L. A. et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 86, n. 10, p. 1166-1175, 2015.

FERNANDES, L. A. et al. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. *Journal of Applied Oral Science*, v. 18, n. 6, p. 635-640, maio 2010.

FERNANDES L. A. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. **Journal of Clinical Periodontology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 219–228, 2009.

FIRATLI E, et al. Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. **Journal of Clinical Periodontology** v. 21, p. 680-683, 1994.

GABLER WL, BULLOCK WW, CREAMER HR. The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. **Journal of Periodontal Research**, v. 22, p. 445-450, 1987.

GARCIA V.G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 5, p. 584-594, 2014.

GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **Journal of Clinical Periodontology**, São Paulo, v. 38, n. 12, p. 1106-1114, 2011.

GARCIA, V. G. et al. Treatment of experimental periodontal disease by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 with scaling and root planing (RAR). **Inflammopharmacology**, v.18, p.293–301, 2010.

GENDRON R, et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, p.437-439, 1999.

GOKHALE SR, PADHYE AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. **British Dental Journal**, v.214, p. 467-471, 2013.

GOLUB LM, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. **Journal of Clinical Periodontology** v. 22, p. 100-109, 1995.

GOULTSCHIN J, LEVY H. Inhibition of superoxide generation by human polymorphonuclear leukocytes with chlorhexidine. Its possible relation to periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 57, p. 422-425, 1986.

GRENIER D. Reduction of proteolytic degradation by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 72, p.630-633, 1993.

JOHNSON IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

KORNMAN KS, PAGE R.C., TONETTI MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**, v. 14, p.112-143, 1997.

LEITE FRM, et al. RANKL expression is differentially modulated by TLR2 and TLR4 signaling in fibroblasts and osteoblasts. **Journal-Immunology Innovation**, v. 2, n. 1, p.1-9, 2014.

LEITE FRM, et al. Relevance of the Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and Nod Expressions Induced by TLR and IL-1R Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. **Inflammation**, p.1-8, 2014.

MARINHO AC, et al. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. **Journal of Endodontics**, v. 41, p. 817-823, 2015.

MATTHEWS D. No difference between 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinse on reduction of gingivitis. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 12, p. 8-9, 2011.

MONTECUCCO F, et al. Chlorhexidine prevents hypochlorous acid-induced inactivation of alpha1-antitrypsin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, p. 72-77, 2009.

NICU EA, LOOS BG. Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. **Periodontology** 2000, v.71 p. 140-163, 2016.

NOGUEIRA-FILHO G. R. et al. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.730-735, 2007.

TERONEN O, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (clodronate). **Calcified Tissue International**, v. 61, p. 59-61, 1997.

TEST ST, WEISS SJ. The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 2, p. 91-116, 1986.

TÜTER G, KURTIS B, SERDAR M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. **Journal of Periodontology**, v. 73, p. 487-493, 2002.

WEISS SJ. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p.365-376, 1989.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Chlorhexidine: action's mechanisms and recent evidences of its efficacy over supragingival biofilm context. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZORKO M, JERALA J. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 730–737, 2008.

Anexos

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética



Pelotas, 22 de março de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor Thiago Marchi Martins

Departamento de Semiologia e Clínica do Centro de Odontologia

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Tratamento da doença periodontal experimental através da irrigação subgengival com diferentes concentrações de clorexidina. Estudo histomorfométrico em ratos”**, processo nº23110.001587/2012-74, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 1587).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA