

Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



**Cavidade oral e efeito do 7,12 dimetilbenzantraceno
(DMBA)**

Gonçalo Nuno Gariso de Sousa Alves

Orientadora: Mestre Dra. Patrícia de Jesus

Co-orientador: Professor Doutor Silvério Cabrita

Coimbra, 2013

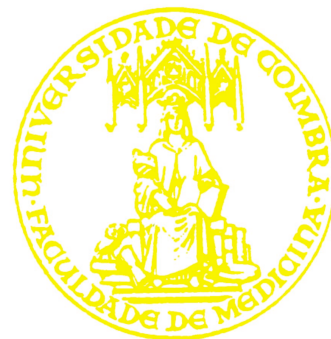
Índice

<i>Resumo</i>	5
<i>Abstract</i>	7
<i>Introdução</i>	9
<i>Material e Métodos</i>	17
<i>Resultados</i>	21
<i>Discussão Conclusões</i>	23
<i>Bibliografia</i>	25

Orientador: Mestre Dra. Patrícia Isabel Miranda de Jesus

Co-orientador: Prof. Doutor Silvério Cabrita

Junho de 2013



Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Agradecimentos

A realização desta tese não teria sido possível sem a ajuda de diversas pessoas que também colocaram muito do seu empenho, dedicação e apoio. Nomeadamente:

À Mestre Patricia de Jesus por me ter esclarecido sobre algumas questões e transmitido informação imprescindível à realização do trabalho.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita por todo o conhecimento transmitido e toda a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização da tese.

Ao Dr. Eduardo Costa que sempre me apoiou muito para além das suas obrigações e fora do seu tempo de trabalho no incansável esclarecimento de dúvidas, análise estatística dos dados e formatação da tese.

Ao Mestre Ricardo Cabeças que teve uma ajuda crucial na análise estatística dos dados.

À Dra. Rita pela sua disponibilidade para esclarecer dúvidas

A todos os meus colegas e amigos agradeço pela amizade e apoio que me deram ao longo de todos estes anos.

E um especial agradecimento a toda a minha família, desde os meus avós, irmão e pais que desde sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram quando necessitei e de uma forma incondicional e agradecer acima de tudo por existirem na minha vida porque se eu existo como sou hoje devo-o a eles.

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Resumo

Muitas das lesões que ocorrem no organismo humano têm como principal causa a acção de xenobióticos presentes no meio ambiente e que entram em contacto com o corpo.

Os xenobioticos além de induzirem lesões morfológicas bem identificáveis, causam também alterações funcionais de gravidade variável. A acção dos xenobioticos sobre o organismo depende de vários factores entre os quais se salientam: a natureza química da molécula, a sua concentração no ambiente, o contacto repetido, a porta de entrada, e a actividade fisiológica do organismo. O DMBA é um tóxico que se encontra no ar contaminado, em alguns alimentos e também no fumo do tabaco⁷. O objectivo deste trabalho é avaliar a influência do DMBA nas alterações morfológicas do ligamento periodontal.

Neste estudo foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com oito semanas no início do estudo. Os ratos foram distribuído por dois grupos com 10 animais cada um. O grupo I constitui o grupo controlo, mantido durante 8 semanas sem qualquer manipulação indutora de alterações. O grupo II foi submetido à administração de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), três vezes por semana, durante 4 semanas, numa dose de 20 mg/Kg em cada toma.

No final do período de administrações todos os animais foram sacrificados, fazendo-se de seguida a respectiva necrópsia.

No grupo I, o valor de R1 foi de $0,07 \pm 0,07$ e R2 de $0,79 \pm 0,25$, não se verificando a presença de DMBA nos adipócitos. A distribuição dos valores de R2 neste grupo foi o seguinte: pequeno 15,38%, médio 69,23%, grande 10,99% e muito grande 3,30%.

No grupo II, o valor de R1 foi de $0,07 \pm 0,04$ e R2 de $0,84 \pm 0,35$. A distribuição dos valores de R2 neste grupo foi o seguinte: pequeno 15,07%, médio 63,01%, grande 8,22% e muito grande 12,33%. Nos animais deste grupo foi detectada a presença de DMBA no tecido adiposo em todos.

O DMBA nas condições estudadas não interfere significativamente com o ligamento periodontal em termos morfológicos.

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Abstract

Many injuries which occur in human body is mainly caused by the action of xenobiotics present in the environment and coming into contact with the body.

The xenobiotics they induce a good morphological identifiable damage, also cause functional alterations of varying severity. The action of xenobiotics on the body depends on many factors among which we highlight: the chemical nature of the molecule, its concentration in the environment, the repeated contact, the gate of entry and the physiological activity of the organism. DMBA is a toxic present in the contaminated environment, in some foods and also in tobacco smoke 7. The aim of this work is to evaluate the influence of DMBA in morphological changes of the periodontal ligament.

In this study was used 20 male Wistar rats, eight weeks at the beginning of the study. The rats were distributed into two groups of 10 animals each. Group I is the control group, maintained for 8 weeks without any inducing manipulation changes. Group II was subjected to the administration of 7,12-dimethyl-benzanthracene (DMBA) three times a week, for 4 weeks at a dose of 20 mg / kg in each takes.

At the end of the administrations, the animals were sacrificed and then making up their necropsy.

In group I, the value of R1 was 0.07 ± 0.07 and R2 was 0.79 ± 0.25 , not checking the presence of DMBA in adipocytes. The distribution of R2 values in this group was as follows: 15.38% small, 69.23% medium, 10.99% large and 3.30% very large.

In group II, the value of R1 was 0.07 ± 0.04 and R2 was 0.84 ± 0.35 . The distribution of R2 values in this group was as follows: 15.07% small, 63.01% medium, 8.22% large and 12.33% very large. The animals in this group was detected the presence of DMBA in adipose tissue at all.

DMBA in the studied conditions does not significantly interfere with the periodontal ligament in morphological terms.

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Introdução

Muitas das lesões que ocorrem no organismo humano têm como principal causa a acção de xenobióticos presentes no meio ambiente e que entram em contacto com o corpo¹.

Os xenobioticos além de induzirem lesões morfológicas bem identificáveis, causam também alterações funcionais de gravidade variável². A acção dos xenobioticos sobre o organismo depende de vários factores entre os quais se salientam: a natureza química da molécula, a sua concentração no ambiente, o contacto repetido, a porta de entrada, e a actividade fisiológica do organismo^{2,3}.

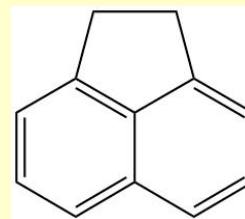
Os xenobioticos costumam ser agrupados segundo as suas características químicas, em vários grupos^{2,4}.

Um dos grupos frequentemente descrito é o dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, onde se incluem mais de 100 moléculas com proveniências muito diversas, desde a combustão de derivados do petróleo, outras combustões como o que acontece no tabaco ou na preparação de alguns alimentos (grelhados). Alguns destes compostos são usados para fabricar medicamentos, tintas ou pesticidas².

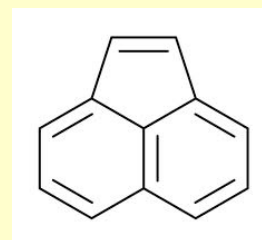
Estes compostos têm sido amplamente estudados devido aos seus efeitos adversos sobre o organismo. A Agência dos Estados Unidos para Substâncias Tóxicas e o registo da doença escolheram dezassete HPAs de maior impacto para a saúde humana⁴: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzantraceno, benzopirenos, benzofluoretano, benzoperileno, benzofluorantenos, criseno, dibenzantraceno, fluoranteno, fluoreno, indenodipireno, fenantreno e pireno.

A contribuição das fontes naturais é muito limitada, restringindo-se praticamente à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas, sendo então a principal fonte a antropogénica. Esta pode-se dividir em quatro grandes grupos:

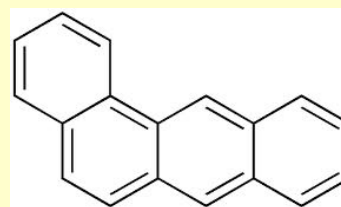
- *Emissões domésticas* - predominantemente associadas à queima de carvão, petróleo, gás, lixo, entre outras substâncias orgânicas



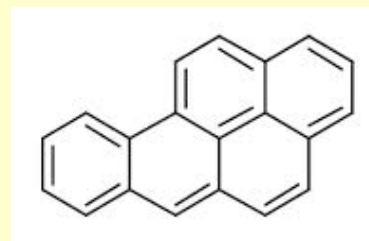
Acenaphthene



Acenaphthylene



benzantracene

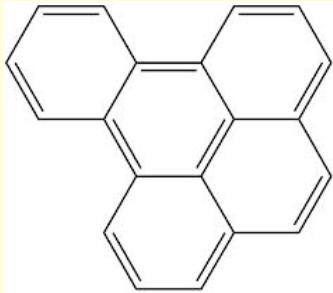


benzo[a]pyrene

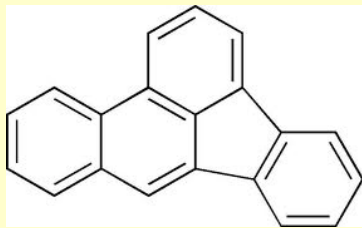
Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

como o tabaco;

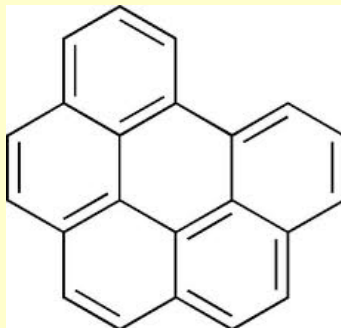
- *Emissões de transportes* - ocorrem essencialmente ao nível do solo. A emissão de HAPs através destas fontes depende de vários factores, como por exemplo, do tipo de combustível e da qualidade deste;
- *Emissões industriais* - estão relacionadas com a produção de coque, produção primária de alumínio e preservação de madeiras;
- *Origens agrícolas* - estão associadas principalmente à queima de matéria orgânica de campos e de florestas³.



benzo[e]pyrene



benzo[b]fluoranthene



benzo[ghi]perylene

Os HAPs podem ser obtidos por síntese química. Os HPAs são um grupo de compostos orgânicos com dois ou mais anéis benzénicos ligados, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogénio organizados sob forma linear, angular ou agrupada⁵. Em virtude das suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. Apresentam uma solubilidade relativamente baixa em água, mas são altamente lipofílicos, sendo por esta razão, rapidamente absorvidos e distribuídos no organismo. A composição e a complexidade das misturas de HPAs dependem das fontes emissoras. Em geral, essas misturas são bastante complexas, contendo uma grande variedade de HPAs, em diferentes níveis de concentração⁵.

De maneira geral, tanto os HPAs quanto os seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de neoplasias no homem¹. A elevada taxa de mortalidade (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de cancro anualmente) e o facto de que os tratamentos para estas doenças serem muito dispendiosos, demorados e normalmente trazerem muito sofrimento para os doentes, expõem assim claramente, os potenciais benefícios de que o entendimento, a avaliação e o controlo da exposição humana a substâncias que possuem actividade carcinogénica/mutagénica podem trazer, particularmente quando se sabe que a grande maioria dos cancros resulta de

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

interacções genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunto com factores de susceptibilidade adquirida, as mais importantes. No caso dos HPAs e derivados, isto é feito geralmente através da monitorização dos níveis ambientais destas substâncias, do conhecimento das vias de penetração no organismo, do seu metabolismo, bem como da avaliação precoce dos seus efeitos fisiológicos. Vários componentes deste grupo são capazes de reagir directamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se potenciais carcinogénicos e eficientes mutagénicos⁵.

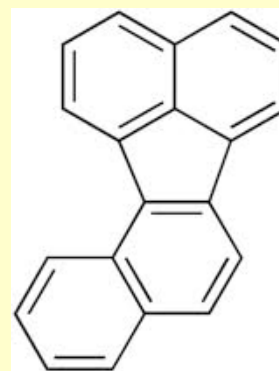
De entre o elevado número de HPAs conhecidos, temos o 7,12 – dimetilbenzantraceno (DMBA); sendo este um dos mais potentes agentes carcinogénicos conhecidos¹.

DMBA

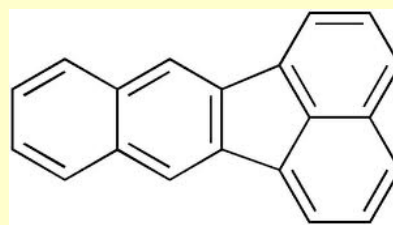
O DMBA é um hidrocarboneto ($C_{20}H_{16}$) com uma massa molar de 256,34 g/mol e ponto de ebulição de 122-123°C sendo classificado como carcinogénico. Apresenta uma estrutura química derivada do antraceno em que a adição do núcleo benzénico à região K e a adição de dois grupos metilo à região L do antraceno, conferem à molécula maior efeito carcinogénico.⁶

Este tóxico encontra-se no ar contaminado, em alguns alimentos e também no fumo do tabaco⁷. Relativamente ao consumo do tabaco em seres humanos podemos referir que está relacionado com uma série de doenças graves, tendo sido sugerido que o seu consumo está associado a 70-80% de tumores orais, e que a percentagem aumenta quando associado ao consumo de álcool⁸. O DMBA encontra-se portanto em grandes concentrações (40-100ng por cigarro) na fracção do alcatrão presente no fumo do “cigarro”^{9,10}.

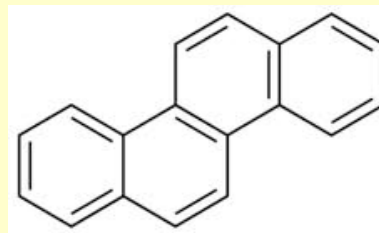
O DMBA é utilizado em laboratório, por vezes, com o objectivo de induzir neoplasias malignas. O DMBA é um potente carcinogénico que induz tumores da pele e da mama, e necrose supra-renal, em ratos. Na literatura encontram-se algumas referências relativamente às doses que provocam estes efeitos. Quando se



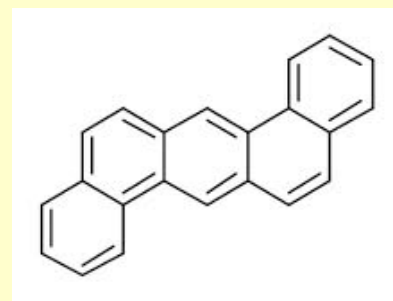
benzo[j]fluoranthene



benzo[k]fluoranthene

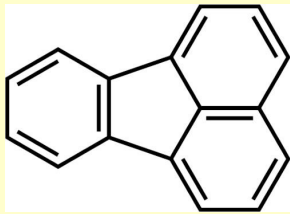


chrysene

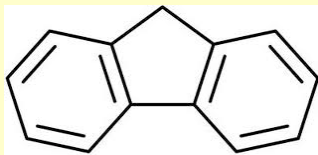


dibenz[ah]anthracene

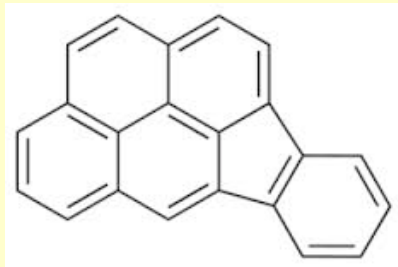
Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno



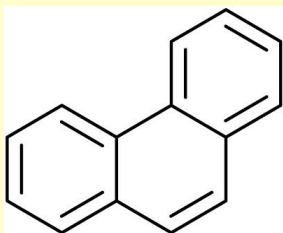
fluoranthene



fluorene



indeno[1,2,3-cd]pyrene



phenanthrene

administra uma dose única de 30 mg (em óleo) por via oral, ou 5 mg por via endovenosa (emulsão líquida), induz tumores mamários em ratos jovens da estirpe Sprague-Dawley e também provoca necrose supra-renal em 2-3 dias. Um outro estudo também demonstrou que uma quantidade menor, 20 mg, dado por via oral, também induz rapidamente tumores mamários. Para uma única dose de DMBA dada na alimentação em ratos de estirpe Sprague-Dawley, a dose letal média (DL50) é de 27 mg/100 g e a dose que provoca lesão supra-renal foi de 30 mg por rato (18 mg/100 g). Para uma única injeção intravenosa, a DL50 é 4,75 mg/100 g e a dose ideal para indução da lesão supra-renal foi de 5 mg por rato (3 mg/100 g) ^{3,6,11,12,13}.

Existem também vários estudos relativamente à indução de tumores de pele provocados por este tóxico^{1 14}.

Sabe-se que o máximo de absorção de DMBA ocorre entre 3-6 horas após a sua ingestão. Na glândula mamária o pico de concentração é encontrado entre 3-6 horas, sendo que estes valores variam nos estudos, provavelmente devido ao uso de diferentes veículos e modos de administração. Estudos indicam que o DMBA é rapidamente absorvido no tracto intestinal e tende a acumular-se no tecido adiposo. O DMBA é rapidamente metabolizado no fígado, sendo a excreção biliar a principal via de eliminação do DMBA. Está estabelecido que 96-97% do DMBA está presente na bÍlis já na forma de metabolitos¹.

O DMBA sofre reacções oxidativas extensas na posição reactiva do anel, para produzir intermediários reactivos electrofílicos. Estes intermediários vão interagir com o DNA e com proteínas e estão potencialmente envolvidos na etiologia de tumores induzidos por químicos. Numerosos estudos detalham a formação tanto de derivados 3,4-epóxido, bem como diol e derivados diol-epóxidos. Ambos os produtos são electrofílicos e foi demonstrado que interagem com o DNA¹

A propriedade carcinogénica do DMBA é atribuída à sua activação em três etapas para o metabolito DMBA-3,4-diol-1,2-epóxido. O

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

DMBA é activado no tecido hepático pela isoforma 1B1 (CYP1B1) do citocromo P450 ao intermediário 3,4-epóxido, que é então hidrolisada a 3,4-diol pelo epóxido hidrolase microssomal. Este composto sofre novamente epoxidação nas posições 1,2 pelo CYP1A1 ou pelo CYP1B1 para formar o metabolito final, DMBA-3,4- diol-1,2-epóxido¹⁵

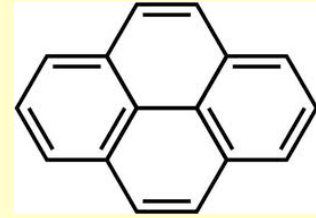
Só é possível quantificar/qualificar os metabolitos do DMBA, se presentes, depois de serem extraídos dos órgãos/tecidos.

Ligamento Periodontal

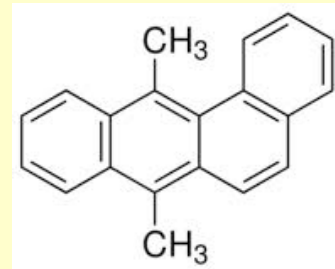
O ligamento periodontal é um denso tecido de colagénio que suporta e ancora o dente ao espaço alveolar. É também considerado um importante componente do sistema de sensibilidade à mastigação devido à sua rica inervação sensorial. Os nervos sensoriais do periodonto são responsáveis pelo toque e pressão assim como a sensação de dor, enquanto os nervos sensitivos do dente apenas transmitem sensação de dor. Muitos investigadores concordam com a noção de que o ligamento periodontal contém dois tipos de receptores: terminais livres sensoriais nociceptivos e mecanoreceptores especializados incluindo corpúsculos Pacian e Meissner. Estímulos mecânicos podem facilmente originar vários reflexos orais, que podem facilitar o processo de mastigação¹⁶.

O ligamento periodontal contém assim, fibroblastos, macrófagos, células indiferenciadas ectomesenquimais, cementoblastos e cementoclastos, osteoblastos e osteoclastos, células epiteliais dos restos de Malassez e elementos vasculares e neurais que são capazes de gerir e manter três tecidos distintos: o ligamento periodontal, e tecidos mineralizados como o cimento e o osso alveolar. Como linhas de células específicas retêm o potencial de regeneração, estimulação e abordagens selectivas para a reorganização de tecidos periodontais de suporte perdidos.

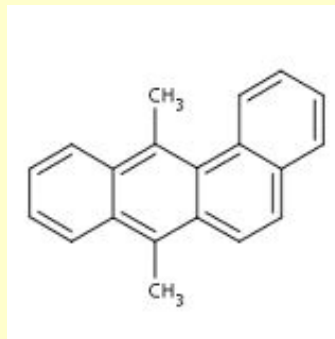
17



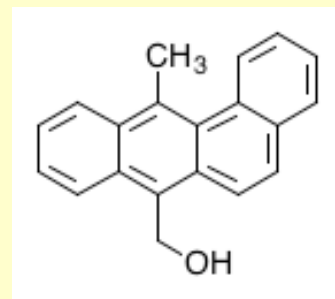
Pyrene



7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)



7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene



7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene;

Factores de risco para a periodontite

- Factores de risco estabelecidos:
 - Bactérias específicas
 - Tabaco
 - Diabetes mal controlada
- Factores de risco potenciais:
 - Polimorfismos genéticos
 - Idade
 - Factores sócioeconómicos
 - Raça/ etnia
 - Sexo
 - Factores psicossociais
 - Osteoporose
 - Obesidade²³

Efeitos da diabetes no periodonto

- Maior prevalência e gravidade de gengivite nos doentes diabéticos, quando comparados com doentes não diabéticos e para níveis similares de placa bacteriana.
- O grau de inflamação gengival aparenta ser directamente proporcional ao descontrolo metabólico do doente diabético.
- O nível de controlo glicémico pode influenciar a resposta gengival à agressão bacteriana no doente diabético.
- Existe uma associação significativa entre diabetes e periodontite.
- Os doentes diabéticos evidenciaram periodontites de extensão semelhantes mas com maior gravidade relativamente aos doentes não diabéticos.

Potencial impacto das populações de fibroblastos na periodontologia

- Gerar e manter a forma dos tecidos
- Patogénese da formação das bolsas periodontais
- Formação de lesões fibrosas na gengiva
- Repopulação de células diferenciadas por barreiras de tecido
- Movimentos ortodônticos e tratamento de recidivas¹⁸

Tecidos especializados como o periodonto incluem interações epitélio-mesenquimais e complexos juncionais (para o dente e tecido de conexão). O periodonto primordial inclui osso alveolar, cemento, epitélio juncional e gengiva aderente. Baseado na sua origem embrionária, os tecidos periodontais são formados pela interação entre as células mesenquimais e epiteliais que respondem de uma forma diferente a uma variedade de estímulos¹⁷. As células progenitoras mais primitivas são encontradas em locais paravasculares do ligamento periodontal e da gengiva. A descendência destas células migra para locais extravasculares onde presumivelmente contribuem para a sua diferenciação e reparação¹⁸. Além disso, a sequência de eventos necessária para uma regeneração periodontal depende de vários processos independentes que poderão estar ligados entre si: osteogénese, cementogénese e formação de tecido de conexão. Na verdade, um ambiente desfavorável e a contínua presença de patogénese e dos seus produtos (principalmente endotoxinas) contaminam a superfície da raiz do dente que é considerado um factor limitante para uma regeneração periodontal previsível.¹⁷

Através da biologia molecular das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) conclui-se que estas induzem a cementogénese e a formação de ligamento periodontal indicando que estas proteínas podem ter diversas funções in vivo não se limitando à indução da formação de cartilagem e osso. Análises histológicas mostraram que as BMPs em conjunto com a matriz de

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

colagénio induziram a regeneração de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar¹⁹.

O problema crucial da regeneração periodontal está na rápida colonização e síntese da matriz extracelular pelos cementoblastos e dos precursores que vão desnudando a superfície da raiz, seguido pela morfogénese das fibras de Sharpey's que se vão inserindo no novo cimento formado.¹⁹

Algumas doenças afectam a composição e integridade das estruturas periodontais causando a destruição do tecido de conexão das células da matriz, a perda de ligação fibrosa e a reabsorção do osso alveolar. Estas mudanças podem levar à perda do dente.²⁰

A doença periodontal é um processo infeccioso caracterizado pela destruição do tecido conjuntivo com perda subsequente de inserção periodontal e reabsorção de osso alveolar. Os responsáveis deste processo são as bactérias anaeróbias Gram negativas e os seus produtos e constituintes tais como os lipopolisacarídeos (LPS)²¹. Na doença periodontal, a perda óssea começa sempre no nível de osso da crista e na sua perda progressiva apicalmente. As lesões típicas são cónicas no contorno. A sondagem pode começar da profundidade do sulco com valores normais, avançando gradualmente passo a passo para apical na extensão da lesão²². O diagnóstico da doença periodontal baseia-se em métodos clínicos e radiográficos. Outros métodos mais recentes têm por objectivo estudar a resposta inflamatória do hospedeiro (métodos imunológicos, bioquímicos). Os componentes do fluido gengivo-crevicular usam-se também para identificar ou diagnosticar a doença periodontal activa²¹.

O objectivo no tratamento periodontal é assim prevenir o mais possível a perda de ligação e regenerar os tecidos de suporte periodontais. Para atingir o sucesso na regeneração periodontal a formação de um epitélio funcional, a inserção de novas fibras de tecido de conexão na raiz, a re-formação de novo cimento acelular na superfície da raiz e a restauração da altura do osso alveolar são

- A perda de inserção periodontal ocorre mais frequentemente em doentes diabéticos não ou moderadamente controlados, tanto do Tipo 1 como do Tipo 2, do que nos com bom controlo metabólico.

- Doentes diabéticos com complicações sistémicas mais avançadas apresentam uma maior frequência e severidade de doença periodontal.

- A presença de marcadores inflamatórios no fluido crevicular gengival evidenciou o estado pro-inflamatório da diabetes, independentemente da presença de periodontite

- Adicionalmente, existe uma diminuição da função dos PMN neutrófilos no fluido crevicular²³.

Efeitos da periodontite na diabetes

- A prevalência da diabetes em doentes periodontais é duas vezes superior à dos doentes periodontalmente saudáveis.

- Foi estabelecida uma associação entre os níveis séricos de TNF- α e a resistência à insulina na diabetes tipo 2.

- A periodontite crónica foi positivamente associada aos níveis plasmáticos de TNF- α em doentes com diabetes tipo 2.

- Doentes com diabetes tipo 2 e periodontite severa apresentavam níveis de HbA1c significativamente elevados e mais complicações cardiovasculares do que doentes diabéticos sem periodontite.²³

Diabetes e tratamento periodontal

- A resposta ao tratamento periodontal em doentes diabéticos controlados é similar à dos doentes não diabéticos.

- Em doentes diabéticos não controlados, a evolução é menos favorável

- A evidência disponível suporta o conceito de um aumento da gravidade da periodontite nos doentes diabéticos mal controlados mas não da sua extensão.

- A periodontite está associada ao mau controlo metabólico da diabetes e às suas complicações não orais.

- Diabéticos controlados apresentam condições periodontais comparáveis à população saudável e respondem favoravelmente ao tratamento periodontal.

- A evidência disponível é ainda inconclusiva relativamente à eficácia do tratamento periodontal na melhoria do controlo metabólico da diabetes e da inflamação sistémica.

- O Médico Dentista deve ter conhecimento sobre a relação bidireccional entre a diabetes e a periodontite.

- O doente diabético deve ser informado desta relação, no sentido de, em conjunto com o Médico Dentista, prevenir ou minorar as complicações tardias da diabetes²³.

requeridas. No entanto, o obstáculo para atingir a regeneração periodontal após os tratamentos convencionais é a proliferação de tecidos epiteliais no defeito mais rapidamente do que os tecidos mesenquimais. Isto leva a uma formação de um epitélio juncional longo, prevenindo a migração selectiva, proliferação e diferenciação de células que derivem do ligamento periodontal.²⁰

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com oito semanas no início do estudo, mantidos nas condições fisiológicas de manutenção e manipulação, de acordo com a legislação em vigor. Foram mantidas todas as condições ambientais que permitem assegurar condições fisiológicas dos animais em ensaio, nomeadamente, temperatura, humidade, ciclos de luz-escuro e condições do chão das gaiolas. A alimentação e o fornecimento de água foi feito tendo em conta os parâmetros anatomofisiológicos da espécie e a manutenção respeitou as condições de higiene e *stress* mínimo dos animais.

Os ratos foram distribuídos por dois grupos com 10 animais cada um. O grupo I constitui o grupo controlo, mantido durante 8 semanas sem qualquer manipulação indutora de alterações. O grupo II foi submetido à administração de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), três vezes por semana, durante 4 semanas, numa dose de 20 mg/Kg em cada toma.

No final do período de administrações todos os animais foram sacrificados por excesso anestésico, administrado por via intramuscular, fazendo-se de seguida a respectiva necrópsia.

A necrópsia permitiu excluir a presença de patologia não induzida. De cada animal foi colhida a mandíbula e feito o estudo dos dentes pré-molares, a partir de lâminas de HE. Foi feita avaliação histopatológica e a análise morfométrica do ligamento periodontal.

A análise morfométrica foi feita em fotografias de dentes, coradas pela Hematoxilina-Eosina, com um aumento de 50 X. Para esta análise foi usado o programa informático ImageJ.

Foi determinada a área do ligamento periodontal, as áreas de hialinização e área dos tecidos duros do respectivo dente envolvido pelo ligamento. Com estes elementos foi calculado para cada caso:



Rato norvegicus

Grupo I

Controlo

8 semanas sem manipulação

Grupo II

7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA)

20mg/kg, três vezes por semana

4 semanas

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

$$R1 = (AH / ALP)$$

$$R2 = ADTD / ALP$$

Rn médio, $Rn \in [Rn-\delta; Rn+\delta]$

Rn pequeno $Rn \in]Rn-\delta; Rn-2\delta]$

Rn grande $Rn \in]Rn+\delta; Rn+2\delta]$

— relação áreas de hialinização (AH) e área total do ligamento (ALP)

$$R1 = (AH / ALP)$$

— relação área de dente-tecido duro (ADTD) e área do ligamento periodontal (ALP)

$$R2 = ADTD / ALP$$

Para cada relação foi calculado o perfil determinado pelos valores c de R1 ou R2 e os respectivos desvios padrões.

Para cada uma destas relações foram consideradas as seguintes possibilidades:

Rn médio, $Rn \in [Rn-\delta; Rn+\delta]$

Rn pequeno $Rn \in]Rn-\delta; Rn-2\delta]$

Rn grande $Rn \in]Rn+\delta; Rn+2\delta]$

Consideraram-se ainda os muito pequenos quando inferior aos pequenos e os muito grandes quando superiores aos grandes.

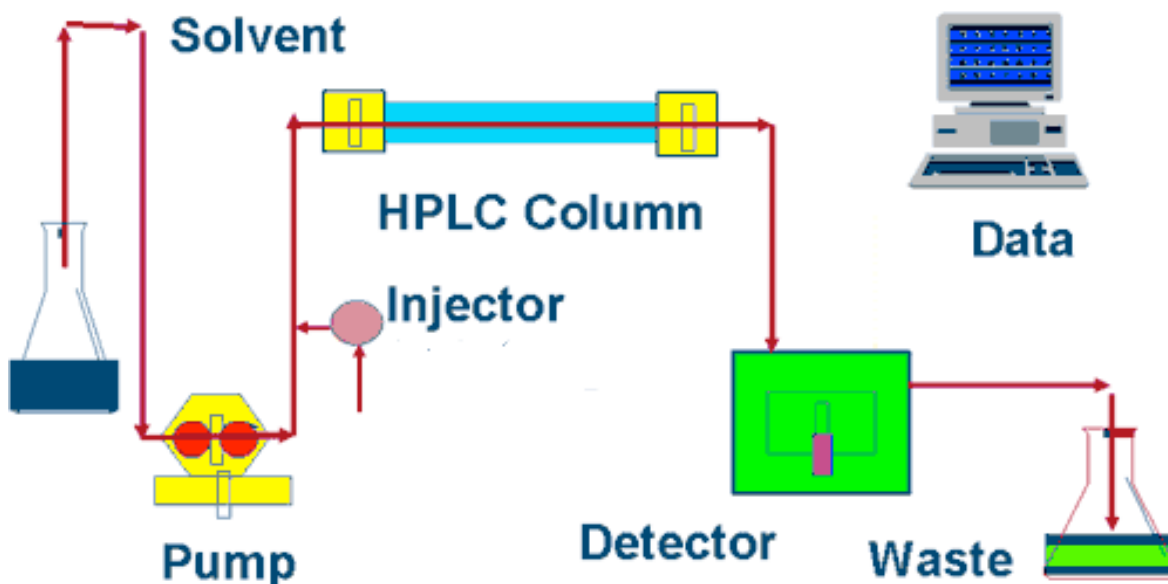
Os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico para calcular a variação para um intervalo de confiança de 95%.

Extracção, identificação e quantificação do DMBA

O isolamento da porção lipofílica de tecido adiposo foi efectuado através de uma extracção líquido-líquido onde se utilizou uma solução clorofórmio/metanol (2:1).

Após a extracção as porções isoladas foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão. Recorrendo a um aparelho equipado com injector automático (Shimadzu, Sil-20AC HT), uma coluna de fase reversa Zorbax ODS (4.6 mm ID x 250mm, 5 µm), com um detector UV-VIS (Shimadzu, SPD-20AV) e um detector de fotodiodos UV-VIS (Shimadzu, SPD-M20A). Como fase móvel utilizou-se um gradiente partindo da mistura 50:50 acetonitrilo:água evoluindo para 100% de acetonitrilo após 30 minutos, com um fluxo de 1 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C em todas as leituras experimentais.

HPLC System



Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Resultados

No grupo I (controlo) a avaliação histológica do ligamento periodontal mostrou não existirem alterações morfológicas significativas. A polpa dentária mostrava-se sem sinais de inflamação ou necrose. Os tecidos duros apresentam uma histologia normal e o ligamento periodontal não mostra aspectos compatíveis com patologia inflamatória ou degenerativa. O osso alveolar apresenta uma histologia sem alterações.

Neste grupo R1 foi de $0,07 \pm 0,07$ e R2 de $0,79 \pm 0,25$. A distribuição dos valores de R2 neste grupo foi o seguinte: pequeno 15,38%, médio 69,23%, grande 10,99% e muito grande 3,30%. Neste grupo a correlação (Pearson) entre área do ligamento periodontal e área de dente (tecido duro) é de 0,876 e a correlação entre a área de hialinização e área do ligamento é de -0,060.

Nos animais deste grupo não foi detectada a presença de DMBA na gordura.

No grupo II (administração de DMBA) a avaliação histológica do ligamento periodontal evidenciou em alguns casos pequenas áreas de hialinização. Histopatologicamente não se encontraram alterações significativas da polpa, ou dos tecidos duros do dente nem do osso alveolar.

Neste grupo R1 foi de $0,07 \pm 0,04$ e R2 de $0,84 \pm 0,35$. A distribuição dos valores de R2 neste grupo foi o seguinte: pequeno 15,07%, médio 63,01%, grande 8,22% e muito grande 12,33%.

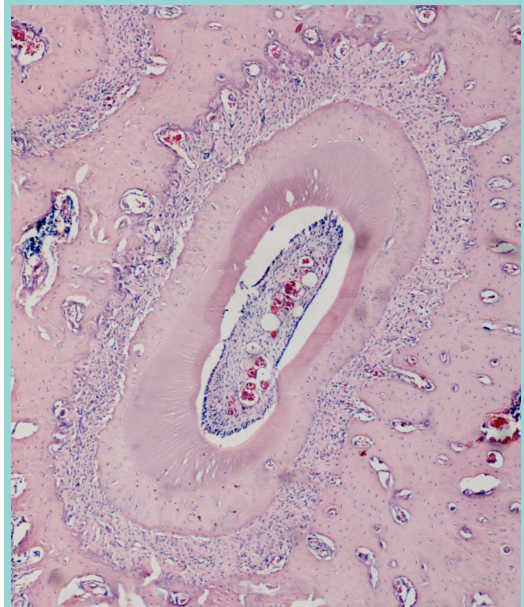
Neste grupo a correlação (Pearson) entre área do ligamento periodontal e área de dente (tecido duro) é de 0,797 e a correlação entre a área de hialinização e área do ligamento é de 0,399.

Nos animais deste grupo foi detectada a presença de DMBA no tecido adiposo em todos, com uma concentração de $4,124 \pm 1,56$ μg de DMBA /d de tecido.

Microfotografias das estruturas dentárias



Grupo controlo, HE, 50X

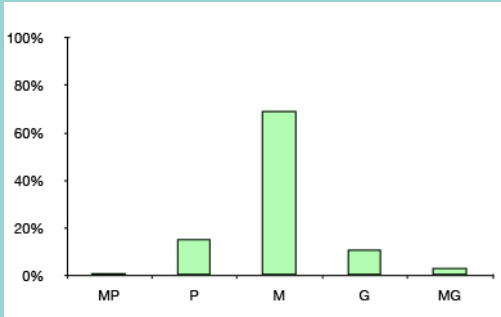


Grupo II (DMBA), HE, 50X

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

Gráficos da distribuição dos valores de R2 para os diferentes grupos

Valores de R2 para o grupo I



Valores de R2 para o grupo II

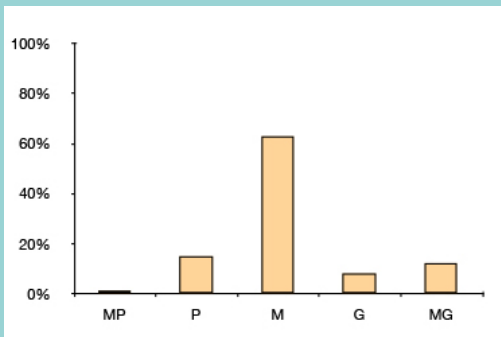


Tabela 1. - Descrição sucinta dos valores de Rn2 pelos grupos.

Rn2	Grupo I	Grupo II
Muito pequenos	1,10%	1,37%
Pequenos	15,38%	15,07%
Médios	69,23%	63,01%
Grandes	10,99%	8,22%
Muito grandes	3,30%	12,33%

Ligamento/Tecidos duros do dente

Grupo I C. Pearson = 0,876

Grupo II C. Pearson = 0,797

Hialinização/Ligamento

Grupo I C. Pearson = -0,060

Grupo II C. Pearson = 0,399

Discussão e Conclusões

O estudo da administração de DMBA simulando uma situação de contacto com este carcinogénio mostrou que existe uma acumulação do tóxico no tecido adiposo. Considerando o peso médio dos ratos e o valor médio do tecido adiposo do animal, que calculamos em 7,5%, verifica-se que o tecido adiposo ao fim de quatro semanas retém ainda cerca de 0,129% da quantidade que foi administrada. Esta quantidade parece-nos bastante significativa, dado que este xenobiótico é de metabolização hepática e fica assim demonstrado que apesar disso, o organismo não se liberta totalmente do tóxico. Uma percentagem permanece armazenada no tecido adiposo.

Estes dados apontam para a necessidade de pesquisar o tóxico noutros tecidos, bem como fazer doseamentos seriados ao longo do tempo, para avaliar quanto tempo será necessário para a sua eliminação total.





Igualmente interessante será perceber o tamanho dos adipócitos na administração deste tóxico, o que pode trazer dados importantes sobre possíveis reacções neste tecido.

Este xenobiótico poderá contribuir também para um estado alterado de saúde, eventualmente com alterações de moléculas que intervêm no apetite ou com a indução de um estado inflamatório de pequena intensidade mas persistente. Para melhor caracterizar estas possíveis situações sugere-se a quantificação de algumas hormonas e de interleucinas da corrente sanguínea.

No que respeita as alterações sobre o ligamento dentário elas são mínimas. Havendo provavelmente uma ligeira hialinização no grupo II. Também as pequenas variações na distribuição de R2 nos sugere a pouca ou nenhuma acção sobre estas estruturas dentárias em termos morfológicos.

Os resultados encontrados apontam que a administração das quantidades usadas, no tempo do ensaio, não causa alterações morfológicas significativas, não se podendo excluir uma acção

Quadro mostrando as variações de Rn2 nos vários grupos

Rn2	Grupo I	Grupo II
Muito pequenos	1,10%	
Pequenos	15,38%	
Médios	69,23%	
Grandes	10,99%	
Muito grandes	3,30%	

Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

lesiva ainda só traduzida por alterações moleculares.

Com estes resultados parece-nos indicado prolongar o ensaio com mais administrações e estabelecer um grupo com administração de maiores concentrações.

Bibliografia

1. Russo, J. Basis of Cellular Autonomy in the Susceptibility to Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 11, 149–166 (1983).
2. Aromatic, P. & Pahs, H. “Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)”. (1996).
3. Isabel, P., Jesus, M. De & Forense, Q. “Avaliação Morfológica e Molecular na Administração Experimental de DMBA”. (2011).
4. Services, H. “Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons”. (1995).
5. Netto, A. D. P., Moreira, J. C., Dias, A. E. X. O., Ferreira, L. F. V & Oliveira, A. S. “Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitratos (NHPAS): uma revisão metodológica”. 765–773
6. Mcmillan, D. C., Fu, P. P. & Cerniglia, C. E. “Stereoselective Fungal Metabolism of Resolution of a K-Region Dihydrodiol”. 53, 2560–2566 (1987).
7. Thakur, P. & Sanyal, S. N. “Induction of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats by a single dose of 9, 10 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and the chemopreventive role of diclofenac”. *Experimental and molecular pathology* 88, 394–400 (2010).
8. Suresh, K., Manoharan, S., Vijayaanand, M. A. & Sugunadevi, G. “Modifying Effects of *Annona Squamosa* Linn on Glycoconjugates Levels in 7, 12- Dimethylbenz (A) Anthracene (DMBA) Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis”. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(8): 973-979, 2010.
9. Roemer, E. et al. “Cytotoxicity, mutagenicity, and tumorigenicity of mainstream smoke from three reference cigarettes machine-smoked to the same yields of total particulate matter per cigarette”. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47, 1810–8 (2009).
10. Lee, L. L., Lee, J. S. C., Waldman, S. D., Casper, R. F. & Grynopas, M. D. “Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model”. *Bone* 30, 917–23 (2002).
11. Yang, S. K. & Dower, W. V “Metabolic pathways of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in hepatic microsomes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 2601–5 (1975).
12. Kernohan, I. R., Inglis, M. S. & Wheatley, D. N. “The effect of



Cavidade oral e 7,12 dimetilbenzantraceno

liver interference on mammary tumour induction by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in Sprague-Dawley rats". *British journal of cancer* 21, 214–7 (1967).

13. Tsuta, K., Shikata, N., Kominami, S. & Tsubura, "a Mechanisms of adrenal damage induced by 7,12-dimethylbenz (alpha) anthracene in female Sprague--Dawley rats". *Experimental and molecular pathology* 70, 162–72 (2001).

14. Corominas, M. et al. "Ras Activation in Human Tumors and in Animal Model Systems". *Environmental health perspectives* 93, 19–25 (1991).

15. Igawa, Y., Keating, A. F., Rajapaksa, K. S., Sipes, I. G. & Hoyer, P. B. "Evaluation of ovotoxicity induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and its 3,4-diol metabolite utilizing a rat in vitro ovarian culture system". *Toxicology and applied pharmacology* 234, 361–9 (2009).

16. Wakisaka, S., Atsumi, Y., Youn, S. H. & Maeda, T. "Morphological and cytochemical characteristics of periodontal Ruffini ending under normal and regeneration processes". *Archives of histology and cytology* 63, 91–113 (2000).

17. Al., M. T. J. et "Current concepts in periodontal bioengineering". *Orthod Craniofac Res.* 2005 Nov;8(4):292-302.

18. Lekic, P. C., Pender, N. & McCulloch, C. a. G. "Is Fibroblast Heterogeneity Relevant To the Health, Diseases, and Treatments of Periodontal Tissues?" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 8, 253–268 (1997).

19. Ripamonti, U. & Hari Reddi, a. "Tissue Engineering, Morphogenesis, and Regeneration of the Periodontal Tissues By Bone Morphogenetic Proteins". *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 8, 154–163 (1997).

20. Benatti, B. B., Silvério, K. G., Casati, M. Z., Sallum, E. A. & Nociti, F. H. "Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells". *Journal of bioscience and bioengineering* 103, 1–6 (2007).

21. Castro, C. E., Koss, M. A. & López, M. E. "Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal". *Med Oral* 2003;8:322-8.

22. Shenoy, N. & Shenoy, A. "Endo-perio lesions: diagnosis and clinical considerations". *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* 21, 579–85

23. Preshaw, P. M. et al. "Periodontitis and diabetes: a two-way relationship". *Diabetologia* 55, 21–31 (2012).

