



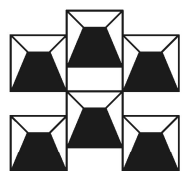
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTAÇÃO EM PERIODONTIA

FELIPE VILHENA BRILHANTE

INFLUÊNCIA DA HIPERTENSÃO NO OSSO ALVEOLAR:
ESTUDO EM RATOS

Guarulhos

2009



UnG

CEPPE

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

FELIPE VILHENA BRILHANTE

INFLUÊNCIA DA HIPERTENSÃO NO OSSO ALVEOLAR:
ESTUDO EM RATOS.

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de mestre em Odontologia
Área de Concentração: Periodontia
Orientador (a): Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos
Co-orientador (a): Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte

Guarulhos

2009

Brilhante, Felipe Vilhena

B857i Influência da hipertensão no osso alveolar: estudo em ratos. / Felipe Vilhena Brilhante. Guarulhos, SP, 2009.

56 f.; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2009.

Orientador: Prof. Dr^a. Marta Ferreira Bastos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Poliana Mendes Duarte

Bibliografia: f. 48-56

1. Doença Periodontal. 2 Hipertensão. 3. Osso alveolar. 4. Lercanidipine. 5. Ligadura I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22st 617.632

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "INFLUÊNCIA DA HIPERTENSÃO NO OSSO ALVEOLAR: ESTUDO EM RATOS" em sessão pública realizada em 15 de Dezembro de 2009, considerou o candidato Felipe Vilhena Brilhante aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) *Marta Ferreira Bastos*

2. Prof. Dr. João Batista César Neto (FOUSP) *João Batista César Neto*

3. Profa. Dra. Claudia Ota Tsuzuki (UnG) *Claudia*

Guarulhos, 15 de Dezembro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, aos meus pais Adalcides Brilhante e Eliana Brilhante, que com muito esforço e dedicação puderam me proporcionar a realização da pós graduação em São Paulo, foram meus acolhedores nos momentos difíceis e incentivadores nos momentos de dúvidas.

A meu irmão Rafael Brilhante que é um exemplo para mim e grande conselheiro em minha vida e a minha irmã gêmea Juliana Brilhante a quem sempre dividi minha meus momentos, tristezas e conquistas. E agora posso compartilhar mais essa conquista com todos de minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho e ter me conduzido pela estrada do conhecimento, me acolhendo e observando meus passos nos dias difíceis e colocando em meu caminho sempre anjos que pudesses me ajudar nesta trajetória.

Agradeço a meus pais e familiares, pois sem eles eu não poderia ter chegado onde cheguei, foram eles que me apoiaram nas minhas decisões.

Agradeço a minha orientador (a) Marta Ferreira Bastos e a minha co-orientador (a) Poliana Mendes Duarte por toda paciência, ensinamentos e amizade que pudemos construir.

Agradeço aos meus amigos onde incluo também meus professores com quem pude contar a cada momento do meu tempo em São Paulo e que sem dúvida compartilham dessa conquista.

A Percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.
(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

Objetivo: Os objetivos do presente estudo foram: 1- avaliar o efeito da hipertensão na perda óssea induzida por ligadura e na qualidade do osso alveolar de suporte dental em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por meio de análises histométricas, histoquímica e imunohistoquímicas e; 2- avaliar os efeitos do anti-hipertensivo lercanidipine, um bloqueador de receptores de canais de cálcio do tipo dihidropiridina, sobre esses parâmetros.

Método: Ratos do tipo Wistar e SHR foram distribuídos a um dos seguintes grupos: Ratos normotensos (NTR) (n=15); SHR não tratados (n=15); SHR tratados (n=15). O último grupo foi tratado diariamente com lercanidipine na dosagem diária de 2,5 mg/kg durante seis semanas. Após duas semanas do início da administração da droga, o primeiro molar direito da mandíbula recebeu a ligadura, enquanto que o dente contralateral esquerdo permaneceu sem ligadura. Os seguintes parâmetros foram analisados na região de furca de secções histológicas descalcificadas: perda óssea, densidade óssea, número de células positivas para fosfatase ácida tartrato-resistente (TRAP), ligante do receptor ativador de NF-kB (RANKL) e osteoprotegenina (OPG).

Resultados: No dente que recebeu ligadura, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação a perda óssea, células positivas para TRAP e proporção de células expressando RANKL/OPG ($p > 0,05$). Um aumento na perda óssea e uma diminuição da densidade óssea foram observados na furca do dente que não recebeu a ligadura de ambos os grupos SHR. Na furca do dente que não recebeu a ligadura, o grupo SHR não tratado apresentou maior número de células positivas para TRAP e proporção de células expressando RANKL/OPG quando comparado aos demais grupos.

Conclusão: Em conclusão, os animais SHR apresentaram um aumento na perda do osso alveolar de suporte dental e uma diminuição da densidade óssea indiferente do acúmulo de biofilme. A administração de lercanidipine durante 6 semanas foi capaz de reduzir a expressão dos marcadores de reabsorção óssea. Porém, estes resultados não foram refletidos nas análises histométricas.

Palavras-chave: hipertensão, periodontite, osso alveolar, ligadura, SHR, TRAP, RANKL, OPG.

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were to evaluate the ligature-induced bone loss and the quality of tooth-supporting alveolar bone in spontaneously hypertensive rats (SHR) by histometric and immunohistochemistry analyses and, to assess the effects of lercanidipine, a dihydropyridine-type calcium antagonist, on these parameters.

Methods: Wistar and SHR rats were assigned to one of the following groups: normotensive rats (NTR) (n=15); Untreated SHR (n=15); Treated SHR (n=15). The latest group was daily treated with lercanidipine during 6 weeks. Two weeks after the beginning of drug administration, the first right mandibular molar received a ligature, while the contralateral tooth was left unligated. The following parameters were analyzed in furcation area of decalcified histological sections: bone loss (BL), bone density (BD), number of positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG).

Results: In ligated teeth, no significant differences among groups were found regarding BL, TRAP+ cells and the ratio of RANKL/OPG+ cells ($p>0.05$). Increased BL and decreased BD were observed around unligated teeth of Untreated and Treated SHR groups. Around unligated teeth, Untreated SHR group presented higher number of TRAP+cells and ratio of RANKL/OPG+ cells when compared to other groups.

Conclusions: In conclusion, SHR presented increased tooth-supporting BL and decreased BD regardless of plaque accumulation. Administration of lercanidipine during 6 weeks was able to decrease the expression of markers of bone resorption without reflection in the histometric parameters.

Key Words: hypertension, periodontitis, alveolar bone, ligature-induced bone loss, SHR, TRAP, RANKL, OPG.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Hipertensão	9
1.2. Tecido Ósseo	13
1.3 Hipertensão e Tecido Ósseo	16
1.4 Hipertensão e Doença Periodontal.	17
1.5 Tratamento anti-hipertensivo e Tecido ósseo	19
1.6 Justificativa	21
2. PROPOSIÇÃO	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

A hipertensão é uma das desordens mais prevalentes em todo o mundo e é caracterizada por uma tensão ou pressão muito elevada nas artérias. A pressão arterial pode ser considerada normal quando a pressão máxima (sistólica) for igual ou inferior a 130 mmHg e, a pressão mínima (diastólica) for igual ou inferior a 85 mmHg. Portanto, o estado hipertensivo pode ser caracterizado quando os valores da pressão sistólica forem iguais ou superiores a 140 mmHg, e os da diastólica forem iguais ou superiores a 90 mmHg (Bakris et al, 2008). Os valores da pressão diastólica são os mais importantes para a determinação da hipertensão devido ao fato da pressão sistólica ser normalmente alterada por variações emocionais e atividade física, enquanto a diastólica esta relacionada ao estado hipertensivo (Reaven, 2006).

Apesar de diversos estudos terem sido realizados para entender a patogênese da hipertensão, diferentes hipóteses foram encontradas na literatura. Guyton et al. (1991) sugerem que alterações renais estariam relacionados a patogênese da hipertensão, entre estas, defeitos na metabolização de sódio pelos rins e a conseqüente alteração dos fluídos corporais. Uma segunda hipótese é de que a hipertensão poderia ser causada por alterações genéticas que afetariam a reabsorção de água e sal pelo néfron distal (Lifton et al, 2001). Outros estudos sugerem que alterações no endotélio poderiam interferir na resistência dos vasos e desta forma levar a um aumento da pressão sanguínea independente de alterações nas funções renais (Huang et al, 1995, Brenner et al, 2000; Zhu et al, 2002; Tang et al, 2003).

A pressão sanguínea pode ser controlada por uma série de mecanismos, dentre eles, o controle pelo reflexo baroreceptor, que é constituído por terminações nervosas localizadas na parede das grandes artérias e que respondem as alterações de calibre do vaso sanguíneo

(Brown et al, 1976, Brown, 1980). Os sinais emitidos pelos barorreceptores atingem principalmente a região do bulbo, e sinais secundários também são emitidos no intuito de excitarem o centro vagal, levando assim, aos efeitos de vasodilatação por todo o sistema circulatório periférico, diminuição da frequência cardíaca e da força de contração do coração. Conseqüentemente estes efeitos desencadeiam uma redução da resistência periférica, do débito cardíaco e da pressão arterial (Andresen et al, 1978). Contudo, o mecanismo de regulação da pressão arterial pelo reflexo baroreceptor é mais eficaz na resposta a pressão que sofre rápida alteração, do que em resposta a uma pressão estacionária. Portanto, este mecanismo possui pouca importância na regulação de longo prazo da pressão arterial (Guyton et al, 1969). A regulação prolongada da pressão arterial envolve outros sistemas de controle, sendo o principal o sistema de controle dos rins e líquidos corporais juntamente com seus mecanismos hormonais associados (Silveira et al, 2008) .

O sistema renina-angiotensina é considerado o principal mecanismo na regulação da pressão arterial. Este sistema é composto por diferentes mediadores como angiotensinogênio (Ang), angiotensina I (Ang I) e II (Ang II), enzima conversora de angiotensina (ECA), renina e pró-renina (Lonn et al, 1994).

A pró-renina é produzida pelas adrenais, retina, ovários e testículos e é considerado o pré-hormônio inativo da renina (Danser et al, 2007). A conversão da pró-renina em renina (forma ativa), pode ser realizada de forma irreversível ou reversível. A forma irreversível ocorre nas células justaglomerulares do rim e pode ser realizada por vários tipos de enzimas como: proconvertase I, catepsina B, tripsina, plasmina e calicreína. Estas enzimas realizam a quebra proteolítica dos 43 aminoácidos da porção N-terminal da pró-renina convertendo-a em renina ao liberar o sítio ativo da enzima durante a quebra (Reudelhuber et al, 1994). A forma reversível de ativação da renina ocorre em sítios não-renais em condições de baixo pH e

hipotermia que propiciam a quebra dos 43 aminoácidos que recobrem o sítio ativo, promovendo a ativação da renina (Reudelhuber et al, 1994, Ménard et al, 2006).

A renina ativa é uma enzima composta por 340 aminoácidos e pertencente à classe da família das aspartil-proteases, apresentando como resíduo crítico para atividade enzimática dois ácidos aspárticos: um na posição 32 e outro na de 215 (Asp32 e Asp 215) (James e Sielecki, 1985). A mesma é responsável pela conversão do Ang em Ang I. O Ang é uma proteína composta por 110 aminoácidos, produzido principalmente no fígado. Sete aminoácidos desta molécula se acomodaram no sítio catalítico da renina, de forma que a ligação peptídica entre a Leucina (décimo aminoácido) e a Valina (décimo primeiro aminoácido) será hidrolisada liberando um decapeptídeo denominado Ang I. A Ang I liberada servirá como substrato para a enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é encontrada no endotélio dos vasos pulmonares e atua na conversão da Ang I em angiotensina II (Ang II) (Verdecchia et al, 2008).

A Ang II é um vasoconstritor extremamente poderoso e exerce outros efeitos que afetam a circulação. Este metabólito pode atuar de duas maneiras na elevação da pressão arterial. A primeira ocorre de maneira rápida para induzir a vasoconstrição que ocasiona a constrição de veias e arteríolas, que leva a um aumento da resistência periférica e promove a elevação da pressão arterial. A Ang II também promove a diminuição da excreção de sal e água pelos rins, o que leva a um aumento lento do volume do líquido extracelular, que conseqüentemente eleva a pressão arterial (Mehta e Griendling, 2007).

A Ang II exerce vários efeitos intra-renais que culminam na retenção de sal e água pelos rins. Um dos mecanismos mais importantes consiste na constrição de vasos sanguíneos renais, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo pelos rins e desta forma uma menor quantidade de líquido é filtrada pelos glomérulos. Outro fator que influencia o menor volume de urina excretado é o fato de quando dentro dos capilares peritubulares o fluxo sanguíneo é

lento, a pressão é reduzida e isso permite uma maior reabsorção osmótica de líquido a partir dos túbulos. Além disso, a Ang II exerce efeito moderado sobre as células tubulares, levando a uma maior reabsorção tubular de sódio e água. O resultado total destes efeitos é significativo na diminuição de até quatro a seis vezes do débito urinário normal (Mehta e Griendling, 2007).

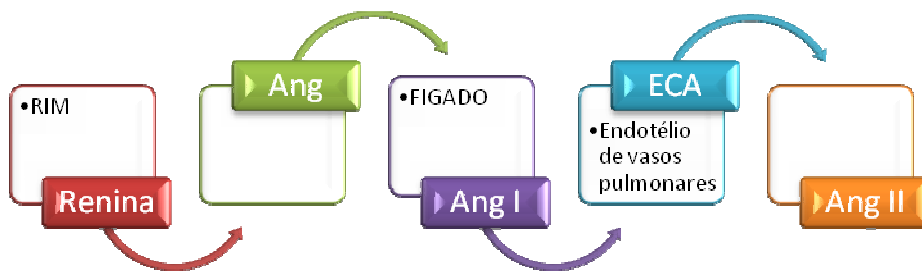


Figura 1- Sistema Renina Angiotensina- mecanismo de formação da Angiotensina II.

Por outro lado, a Ang II estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, e esta por sua vez aumenta a absorção de sal e água pelos túbulos renais. A aldosterona é um dos componentes importantes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, desempenhando um papel importante na regulação de eletrólitos e equilíbrio hídrico (Jennings et al, 2005, Connell e Davies, 2005). A maioria dos efeitos induzidos pela aldosterona ocorre após sua ligação ao mineralocorticoide (MR) intracelular. A ativação do complexo aldosterona-MR o transloca para o núcleo, onde irá modular a transcrição e a tradução da proteína “induzida por aldosterona” envolvida na homeostasia da pressão arterial (Bunda et al, 2009). A aldosterona atuará principalmente no túbulo contornado distal do néfron fazendo com que ocorra uma maior reabsorção de sal e água. Isso acaba provocando um aumento no volume sanguíneo e, conseqüentemente um aumento no débito cardíaco e na pressão arterial. O hormônio mineralocorticoide aldosterona também atua em tecidos como o coração e vasos

sanguíneos retendo sódio e excretando potássio, níveis elevados deste hormônio podem causar doenças cardiovasculares (Rocha e Funder, 2002).

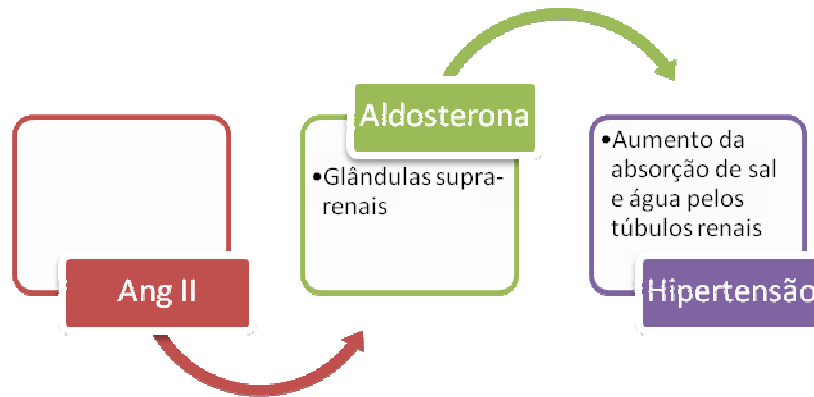


Figura 2- Angiotensina II estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas supra renais.

Na tentativa de facilitar os estudos sobre a história natural, os determinantes genéticos e as alterações patofisiológicas da hipertensão, Okamoto e Aoki (1963) desenvolveram uma linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por meio de seleção genética e endocruzamentos. Trippodo e Frohlich (1981) demonstraram a existência de diversas similaridades entre esta linhagem de ratos e humanos em relação às alterações hemodinâmicas, vasculares, neurais, renais e humorais observadas na hipertensão. Desde então, os ratos do tipo SHR têm sido utilizados como um excelente modelo para o estudo da hipertensão essencial devido as vantagens apresentadas tais como: curto período de vida, pequeno tamanho e custo relativamente baixo que podem proporcionar a compreensão da etiologia e novas abordagens terapêuticas nos estudos de hipertensão.

1.2. Tecido ósseo

Durante toda a vida, o osso está constantemente sendo remodelado, por osteoclastos que desmineralizam e reabsorvem o osso “velho” e por osteoblastos que depositam osso “novo” para manter a massa óssea apropriada. Qualquer alteração neste equilíbrio de remodelação óssea pode alterar a densidade óssea mineral, comprimento e a micro arquitetura do tecido ósseo. A causa mais comum de desequilíbrio no processo de remodelamento ósseo ocorre pelo aumento na atividade de osteoclastos, que leva a um aumento da reabsorção e

conseqüentemente a diminuição da densidade óssea (Wright et al, 2009). As alterações no equilíbrio entre a função de osteoclastos e osteoblastos pode ser desencadeada por mudanças hormonais e pela produção de citocinas inflamatórias que podem levar tanto a uma perda de massa óssea (osteoporose), quanto ao aumento de massa óssea (osteopetrose).

Estudos moleculares têm levado a uma melhor compreensão dos mecanismos e proteínas envolvidas na reabsorção óssea. Atualmente, sabe-se que este processo é controlado por um sistema composto principalmente por três proteínas: RANK (receptor do ativador do fator nuclear kappa beta), seu ligante RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa beta) e o “competidor natural” por RANKL chamado de OPG (osteoprotegerina) (Leibbrandt et al, 2008).

RANK é uma glicoproteína transmembrana composta por 616 aminoácidos e membro da família de receptores do TNF- α (fator de necrose tumoral) (Anderson et al, 1997, Hofbauer e Heufelder, 2001). A expressão do RANK ocorre em diversas células tais como: precursores de osteoclastos, osteoclastos, monócitos circulantes e células dendríticas (Wright et al, 2009).

RANKL é uma citocina semelhante ao TNF- α e pode ser expressa por vários tipos celulares como osteoblastos e seus precursores, linfócitos T, linfócitos B, megacariócitos e, também pode ser encontrado na sua forma solúvel (sRANKL). A expressão de RANKL pode ser estimulada por citocinas como IL-1 e TNF α , paratormônio (PTH) e prostaglandina (PG) E2 (Hofbauer e Heufelder, 2001). Um aumento na produção de RANKL por células osteoblásticas leva a diferenciação, ativação e aumento do tempo de sobrevivência de osteoclastos, e conseqüentemente ao aumento da reabsorção óssea (Ikeda et al, 2001).

OPG assim como RANK pertence a família dos receptores de TNF e foi nomeado de acordo com o efeito protetor que apresenta sobre o tecido ósseo (em latim *os*: significa osso e *protegere*: significa proteção). OPG é uma glicoproteína solúvel secretada por várias células mesenquimais tais como osteoblastos e células da medula óssea (Simonet et al, 1997). O OPG

atua como um competidor de alta afinidade pela ligação com o RANKL, e desta forma previne a interação do RANKL com o RANK. Conseqüentemente, a ligação do OPG ao RANKL atua como um inibidor efetivo da diferenciação e ativação de osteoclastos e assim inibe a reabsorção óssea (Kong et al, 2000). Sua produção pode ser modulada por diferentes mediadores, tais como: interleucina 1, TNF- α e TGF- β que promovem o aumento da secreção de OPG e, a diminuição da síntese da mesma pode ocorrer pela ação de estimulantes da reabsorção óssea tais como PTH e PGE2 (Hofbauer e Schoppet, 2004).

A interação de RANKL com o RANK presente na superfície de células precursoras de osteoclastos atua como principal mecanismo molecular pelo qual é desencadeado o processo de reabsorção óssea. Esta ligação ativa uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$). O NF- $\kappa\beta$ é um fator de transcrição pleiotrópico que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e também na ativação de osteoclastos maduros (Soysa e Alles, 2009). Desta maneira, o NF- $\kappa\beta$ regula a formação, função e sobrevivência de osteoclastos e a síntese de vários mediadores, entre estes, a fosfatase ácida tartrato resistente (TRAP) (Wada et al, 2006)

O TRAP é uma enzima que faz parte da família das fosfatases ácidas e apresenta localização intracelular, mais especificamente dentro do compartimento lisossomal de osteoclastos, macrófagos e células dendríticas, embora alguns estudos também demonstrem que esta enzima seja secretada (Habermann et al, 2007). Possui importante participação em processos biológicos que incluem o desenvolvimento do esqueleto porque apresenta efeito negativo sobre atividade de osteoblastos e é essencial para atividade de reabsorção desempenhada pelos osteoclastos. Roberts et al. (2007) demonstraram que TRAP tem função fundamental no processo de síntese e processamento de colágeno tipo I, um dos principais componentes de matriz óssea (Haymam, 2008). Esta enzima também apresenta efeito sobre a mineralização do tecido ósseo por degradar osteopontina e, devido a todas estas atividades

sobre tecido ósseo, o TRAP tem sido utilizado como um marcador histoquímico da atividade osteoclástica (Habermann et al, 2007).

1.3 Hipertensão e Tecido Ósseo

Estudos clínicos que avaliaram o efeito da hipertensão sobre tecidos ósseos apresentam resultados controversos. Alguns estudos relataram que a hipertensão pode afetar o tecido ósseo por promover o aumento dos níveis séricos de cálcio. Esta condição poderia levar ao aumento de perda mineral óssea sugerindo uma associação negativa entre pressão sanguínea e densidade mineral óssea (MaCarron, 1982, MacGregor e Cappuccio, 1993). Recentemente, Shimizu et al. (2008) demonstraram uma associação entre elevação da pressão sanguínea com aumento na perda óssea, especialmente em mulheres idosas. Entretanto, Larijani et al.(2004) não demonstraram associação entre densidade óssea do fêmur com aumento da pressão sanguínea em indivíduos do sexo masculino. Os autores sugeriram que outros estudos devem ser realizados para compreender as relações existentes entre densidade óssea e hipertensão em humanos.

Estudos utilizando a linhagem SHR também têm tentado esclarecer a relação existente entre hipertensão e tecido ósseo, e os resultados sobre os efeitos deletérios da hipertensão sobre este tecido parecem menos controversos que os estudos clínicos.

Wang et al. (1993) demonstraram uma queda na concentração de cálcio e na absorção intestinal do cálcio levando ao aumento de cálcio na urina. Além disto, os SHR apresentaram uma menor taxa de crescimento longitudinal, menor volume ósseo acompanhado por uma pobre arquitetura trabecular. Também foi observado um aumento significativo no número de osteoclastos e na proporção osteoclastos/osteoblastos. Inoue et al. (1995), avaliaram o crescimento ósseo de ratos SHR e Sprague-Dawley (SD) e os resultados mostraram que os SHR de ambos os sexos apresentavam menor densidade óssea mineral que os SD. Os autores sugerem que o osso trabecular dos ratos SHR apresentaram um menor conteúdo mineral que

os ratos SD e, que esta alteração pode acontecer devido a um anormal processo de mineralização. A avaliação histométrica de animais SHR do sexo feminino submetidos ao processo de ovariectomia demonstrou que estes animais apresentavam uma diminuição da densidade óssea quando comparados aos normotensos (Liang et al,1997). Outro estudo avaliou a influência da hipertensão sobre a densidade óssea mineral demonstrando que o conteúdo mineral (cálcio, magnésio e fósforo) são menores em ratos SHR comparados aos ratos normotensos da linhagem Wistar. Os autores também demonstraram que o aumento de cálcio na dieta protege o osso contra o potencial deletério (Metz et al, 1990). Wright e DeMoss (2000) demonstraram que animais SHR apresentaram maior reabsorção óssea quando comparado aos ratos normotensos. Esta alteração foi mais evidente em fêmeas quando comparada aos machos SHR.

Estudo recente *in vitro* tentou esclarecer a relação entre hipertensão e osteoporose, avaliando o papel da Ang II sobre o metabolismo ósseo. Foi observado que a Ang II induz a expressão de RANKL, o que leva a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Os autores sugeriram que drogas que bloqueiam a atividade da Ang II podem tornar-se uma boa estratégia terapêutica na prevenção da osteoporose em pacientes hipertensos (Shimizu et al, 2008).

É importante ressaltar que embora alguns estudos tenham observado os efeitos da hipertensão nos tecidos e células ósseas, pouca informação existe sobre o efeito dessa desordem no osso alveolar (Leite et al, 2005).

1.4 Hipertensão e Doença Periodontal

A doença periodontal é definida como uma doença infecciosa que tem como fator etiológico o biofilme bacteriano que atua afetando as condições de saúde dos tecidos de proteção (tecido gengival) e sustentação (osso, cemento e ligamento) do elemento dental (Papapanou et al, 1991). A doença periodontal restrita ao tecido gengival é denominada

gingivite, que pode ser transitória ou persistente, e pode ou não progredir para os tecidos de sustentação do dente (American Academy of Periodontology, 1999). A lesão inicial apresenta-se na forma de uma resposta inflamatória aguda com característico infiltrado neutrofílico. Este quadro pode progredir para uma lesão primária, caracterizada pela perda de colágeno e presença predominante de linfócitos T. A lesão estabelecida apresenta presença de linfócitos B e plasmócitos (Page, 1987). A progressão da gengivite diagnosticada pela perda do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar caracterizam clinicamente a presença da periodontite e resultam, muitas vezes, na perda do elemento dental (Armitage, 1996). A periodontite é considerada a principal causa de perda dental em indivíduos adultos e apresenta similaridades histopatológicas com a lesão estabelecida da gengivite, com um predomínio de plasmócitos (American Academy of Periodontology, 1999).

Embora a presença da placa bacteriana seja responsável pelo início da doença, a progressão da mesma depende da interação entre os microorganismos e a resposta do hospedeiro. Fatores como idade, tabagismo e diabetes são reconhecidos em aumentar o risco de desenvolvimento de periodontite (Grossi et al, 1997, Albandar, 2002). Outros fatores como stress, obesidade e osteoporose são também associados com aumento na prevalência de periodontite (Genco et al., 1996; Al-Zahrani et al., 2005; Lerner, 2006).

Alguns estudos têm sugerido uma associação entre infecção periodontal e risco aumentado de doenças sistêmicas, como doença cardiovascular (DeStefano et al., 1993; Scannapieco, 1998; Holmstrup et al., 2003). Embora alguns estudos tenham demonstrado uma associação entre hipertensão e risco aumentado de injúrias teciduais incluindo tecido ósseo, renal, cardíaco, entre outros; estudos que avaliem o efeito da hipertensão sobre os tecidos periodontais são escassos.

Arendt e Elzay (1976) realizaram um estudo que avaliou a perda óssea do tecido periodontal em trinta e nove pacientes hipertensos e normotensos por meio de radiografias.

Foi observada em pacientes hipertensos apresentavam uma maior perda óssea quando comparados com os normotensos.

Outros estudos fazem associação entre doença periodontal com disfunção endotelial e inflamação sistêmica, sugerindo que indivíduos com periodontite apresentam um quadro de significativa disfunção endotelial (Amar et al, 2003). Higashi et al. (2008), avaliaram a função endotelial de pacientes hipertensos com periodontite e sugeriram que pacientes hipertensos com função endotelial prejudicada poderiam ter o quadro patológico agravado pela presença da doença periodontal.

Engström et al. (2007) realizaram um estudo em que foi avaliada a associação entre elevada pressão sanguínea e bolsas periodontais profundas em 1.239 pacientes selecionados, que apresentavam idade entre 35 e 65 anos. O estudo mostrou que elevada pressão sanguínea está significativamente associada com um aumento na prevalência de bolsas periodontais profundas após ajuste das variáveis como idade, sexo, fumo e número de dentes.

Estudos experimentais também sugerem uma associação entre doença periodontal e hipertensão. Em 2000, Sobainec e Sobainec-Lotowska demonstraram um aumento da vascularização dos tecidos periodontais no modelo da ligadura para animais hipertensos. Leite et al. (2005) demonstraram que o processo inflamatório nos tecidos periodontais e a perda óssea alveolar induzida por ligadura foram significativamente maior em ratos hipertensos quando comparado aos normotensos.

1. 5 Tratamento anti-hipertensivo e Tecido ósseo

Uma vez demonstrado o efeito deletério da hipertensão sobre os tecidos ósseos, estudos que avaliem o efeito protetor de anti-hipertensivos sobre o tecido ósseo devem ser considerados.

As drogas usadas para o tratamento da hipertensão podem ser do tipo: bloqueadores de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), os antagonistas do receptor

tipo 1 de angiotensina II (AT1) e diuréticos (Nishiya e Sugimoto, 2001). Efeitos protetores ou não do tecido ósseo são descritos para as diferentes categorias de antihipertensivos.

Ma et al. (1997) demonstraram que o tratamento associado do anti-hipertensivo moexipril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) com a hidroclorotiazida, um diurético pertencente ao grupo das tiazidas, apresentou um efeito na redução da pressão arterial, e interessantemente demonstrou um efeito protetor para o tecido ósseo de SHR osteopênicos. Porém, a administração de outro medicamento também pertencente a categoria de inibidor da ECA, o enalapril e de losartan, um antagonista do receptor AT1 não causaram mudanças significativas na densidade óssea (Broulik et al, 2001).

Os antagonistas de receptores de cálcio são um grupo heterogêneo de agentes anti-hipertensivos que incluem a fenilalquilamina, verapamil, o benzodiazepino, diltiazem e a dihidropiridina (DHPs). Esta categoria de agentes anti-hipertensivo têm sido recentemente escolhidas para tratamento da hipertensão por produzirem efeitos diuréticos similares, β -bloqueadores, e inibidores de ACE em relação a prevenção da mortalidade por doenças cardiovasculares e por reduzirem as taxas de infarto em pacientes idosos hipertensos com hipertensão sistólica isolada (Allhat Officers and Coordinators, 2002).

Uma categoria em especial dos anti-hipertensivos bloqueadores de cálcio, as DHPs atuam primeiramente como vasodilatadores, porém alguns medicamentos como a felodipina produzem efeito indesejado de taquicardia. Ao longo dos anos, modificações foram feitas na tentativa de se prolongar o tempo de duração destes medicamentos e diminuir suas reações adversas, no entanto, a amilodipina foi a primeira droga DHP que se conseguiu duração prolongada (Hardy et al, 1988, Bainbridge et al, 1991, Binggeli et al, 2002, Massicotte et al, 2003, Wirtz e Herzig, 2004).

Dentre as terapias propostas para controle da hipertensão encontra-se um medicamento que pertence a última geração dos antagonistas de receptores de cálcio do tipo DHP, a

lercanidipine. Este medicamento apresenta uma meia-vida prolongada e uma alta capacidade de sustentar a vasodilatação sem ativação simpatomimética, diminuindo edema periférico e eventos cardiovasculares (Borghi, 2005; Makarounas-Kirchmann et al, 2009). Estudos pré-clínicos sugerem que a lercanidipine pode ter efeito benéfico tanto na aterosclerose quanto na hipertrofia ventricular esquerda. A eficácia e tolerabilidade deste medicamento o tornam uma escolha adequada para o tratamento da hipertensão para uma ampla gama de pacientes (Borghi, 2005). Uma vez que bloqueadores de canais de cálcio atuam inibindo o influxo de cálcio por meio dos canais de cálcio tipo-L e que células osteoblásticas apresentam estes receptores em sua superfície, é possível sugerir que a sinalização por meio dos canais de cálcio tipo L poderia influenciar a função de osteoblastos. Nishiya e Sugimoto (2001) demonstram que a benidipina, um bloqueador de canais cálcio tipo-L foi capaz de aumentar a atividade de fosfatase alcalina e promover a mineralização de células de linhagem osteoblástica. No entanto, o efeito da lercanidipine sobre tecidos ósseos não foi avaliada até o momento.

1.6 Justificativa

Baseado nas evidências que demonstram que a hipertensão é uma das desordens sistêmicas mais prevalentes no mundo associado aos estudos que sugerem um efeito deletério do estado hipertensivo sobre o tecido ósseo, e na escassez de estudos sobre a relação entre osso alveolar, hipertensão e doença periodontal, parece importante avaliar o impacto da hipertensão sobre o tecido ósseo periodontal.

2. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o osso alveolar de ratos normotensos e hipertensos tratados ou não com antihipertensivo lercanidipine, por meio de análises histométrica, histológica e imunohistoquímica comparadas aos normotensos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

HYPERTENSION MAY AFFECT ALVEOLAR BONE QUALITY: A STUDY IN RATS

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were to evaluate the ligature-induced bone loss and the quality of alveolar bone in spontaneously hypertensive rats (SHR) by histometric and immunohistochemistry analyses and, to assess the effects of lercanidipine, a dihydropyridine-type calcium antagonist, on these parameters.

Methods: Wistar and SHR rats were assigned to one of the following groups: normotensive rats (NTR) (n=15); Untreated SHR (n=15); Treated SHR (n=15). The latest group was daily treated with lercanidipine during 6 weeks. Two weeks after the beginning of drug administration, the first right mandibular molar received a cotton ligature, while the contralateral tooth was left unligated. The following parameters were analyzed in furcation area of decalcified histological sections: bone loss (BL), bone density (BD), number of positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG).

Results: In ligated teeth, no significant differences among groups were found regarding BL, TRAP+ cells and the ratio of RANKL/OPG+ cells ($p>0.05$), although the expression of RANKL was decreased in Treated SHR group ($p<0.05$). Increased BL and decreased BD were observed around unligated teeth of Untreated and Treated SHR groups ($p<0.05$). In the furcation area of unligated teeth, Untreated SHR group presented higher number of TRAP+cells and ratio of RANKL/OPG+ cells when compared to other groups ($p<0.05$).

Conclusions: In conclusion, SHR presented harmful alterations in tooth-supporting bone quality independent of plaque accumulation. In addition, administration of lercanidipine during 6 weeks was able to decrease the expression of bone resorption markers.

Key Words: hypertension, periodontitis, alveolar bone, ligature-induced periodontitis, rat, TRAP, RANKL, OPG

INTRODUCTION

Human essential hypertension is a highly prevalent chronic vascular disorder that has multifactorial etiology, which complications such as cardiovascular and kidney diseases are major public health problems (Johnson et al. 2008). Various experimental and clinical studies have shown that hypertension presents prejudicial effects on bone density and quality (Izawa et al. 1985, Liang et al. 1997; Wright and DeMoss 2000, Gotoh et al. 2005, Mussolino and Gillum 2006, Vestergaard et al. 2009). The physiological, cellular and molecular mechanisms by which essential hypertension may affect bone tissues have not been fully elucidated. It has been suggested that a hypertensive status causes increased mobilization of calcium from bone, increased excretion of calcium from kidney, secondary activation of the parathyroid hormone (PTH) and bone cell activity and differentiation alterations mediated by angiotensin II (McCarron et al. 1980; Strazzullo et al.1983; Young et al. 1990; Oshima and Young 1995).

The relationship between hypertension and periodontal tissues/periodontitis has being already evaluated by some investigations (Arendt and Elzay 1976; Perlstein and Bissada 1977; Angeli et al. 2003; Holmlund et al. 2006; Leite et al. 2005; Al-Emadiet al. 2006). With the emergence of periodontal medicine, most studies have currently focused on periodontal infection acting as a source of pathogenic species and inflammatory mediators that create a systemic inflammatory burden and increase the risk for hypertension and other cardiovascular disorders development (Haraszthy et al. 2000; De Nardin 2001; Beck and Offenbacher 2005; Boos and Lip 2005; Vidal et al. 2009). However few studies have focused on the impact of the hypertensive status on periodontal tissues (Arendt and Elzay 1976; Perlstein and Bissada 1977, Castelli et al. 1978, Leite et al. 2005) and, even a smaller number of reports have evaluated the effect of elevated blood pressure on alveolar bone in the presence of infectious challenge and under local healthy condition (Arendt and Elzay 1976; Leite et al. 2005).

Therefore, considering the high prevalence of hypertension and the importance of alveolar bone in the implantology and periodontal fields, the aims of this study were: (i) to evaluate the ligature-induced bone loss and the quality of alveolar bone in spontaneously hypertensive rats (SHR) by histometric analyses; (ii) to assess the effects of lercanidipine, a dihydropyridine-type calcium antagonist used in treatment of hypertension, on the tooth-supporting alveolar with and without ligature in SHR. In addition, to explain, at least in part, the molecular mechanisms linking hypertension and alveolar bone, the most coronal 300µm of bone crest at the furcation areas of ligated and unligated teeth were chosen for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) immunohistochemistry. Osteoclast formation and activation is coordinated by the interaction of the receptor activator of NF-κB (RANK) and its ligand RANKL, inducing physio- and pathological bone resorption (Wright et al. 2009). Inhibition of RANKL function via the decoy OPG significantly reduces osteoclastogenesis and bone resorption. Therefore, RANKL and OPG, as well as its ratio, may be considered important markers of bone metabolism as TRAP expression have been suggested as a useful indicator of bone resorption (Hallen et al. 2006).

MATERIALS AND METHODS

Animals

The Institutional Committee of the Animal Care and Use from the Guarulhos University (Guarulhos, São Paulo, Brazil) previously approved this protocol (P004/2008). Fifteen male normotensive Wistar rats (NTR) and thirty SHR obtained from University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) were used in this study. The rats were 90 days of age and weighed approximately 235 ± 17 g at the beginning of the study. During the acclimatization (5 days) and experimental period (45 days), animals were housed in groups of five in plastic cages with access to food (Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil) and drinking

water *ad libitum* in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University. The rats were kept in a room with a 12-hour light/dark cycle and temperature between 22°C and 24°C.

Experimental design and ligature placement

The animals were assigned to one of the following experimental groups: NTR, control (n=15); Untreated SHR (n=15); Treated SHR (n=15). The latest group was daily treated by gavage with lercanidipine (2.5 mg/kg body weight/day; Medley, Campinas, Brazil) (Sabbatini et al., 2000) diluted in water while the other groups received only water (placebo) during 45 days. Fifteen days after the beginning of lercanidipine/placebo treatments, the animals were submitted to general anesthesia by intramuscular administration of xylazine (0,3 ml/kg; Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil) and ketamine (0,5ml/Kg; Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil). Subsequently, a cotton ligature was placed in the cervical position of the first right mandibular molar in order to induce experimental alveolar bone loss while the contralateral molar was left unligated. Thirty days after ligature placement, corresponding to 45 days after the beginning of drug/placebo administration, the animals were sacrificed by CO₂ inhalation.

Histological procedures and histometric analysis

The jaws were removed and fixed in modified Karnovsky solution (2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde and 0.2% picric acid) for 24 hours. Subsequently, the specimens were decalcified in a solution containing 10% ethylene-diamine tetraacetic acid during 60 days, dehydrated in an ascending series of ethanol solution and embedded in paraffin. Serial sections (5 µm) were obtained in a mesio-distal direction and stained with hematoxylin and eosin solutions. After excluding the first and last sections in which the furcation area was totally evident, ten equally distant sections of each molar were chosen for histometric evaluations. The area between interradicular bone crest and furcation roof (BL/mm²) of both molars was histometrically determined. For the analysis of tooth-

supporting alveolar bone density (BD), a standardized rectangular area (1 mm²) was delimited in the furcation area of the unligated teeth. Subsequently, a checkered diagram was overlaid on this area, constituting a drawing with 358 intersections. The number of intersections, under which bone tissue was present, was counted. BD was calculated according to the following formula: $BD \times 100 / 358$. Both analyses were performed by one trained, calibrated and blinded examiner using an image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

TRAP staining

TRAP staining, a marker of bone resorption, was performed to identify and quantify bone-resorption related cells of five animals in each group. Two sections of the central portion of the teeth were deparaffinized and incubated at 37°C for 15 min in a solution containing 4mg of naphthol AS-BI (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 24 mg of red violet salt (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 30mL of acetate buffer (pH 5.2) and 0.3 mmol/L of tartrate (pH 5; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Subsequently, the section were washed in distilled water and counter-stained with hematoxylin. Consecutive sections were incubated in substrate-free medium to be used as negative control for TRAP activity (Cole and Walters 1987). The number of TRAP+ cells was counted at x40 magnification in a 300µm zone under all extension of the furcation bone crest for ligated and unligated molars, using an image analysis software (Image J, NIH, Bethesda, MD, USA) by two trained, calibrated and blinded examiners.

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical assay was carried out as described elsewhere (Hassumi et al. 2009). Sections of five rats per group were mounted on glass slides pre-treated with 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and used for immunohistochemical analysis. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 30

minutes to eliminate endogenous peroxidase. The sections were blocked with PBS-1% bovine serum albumin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 minutes at room temperature before incubation with the primary antibody (polyclonal antibodies against RANKL [1:50] or OPG [1:10], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 2 hours at room temperature. Biotinylated secondary antibody was used (1:100) for 60 minutes at room temperature. The slides were treated with the conjugate Avidin-alkaline phosphatase ([1:100] Vectastain ABC-AP Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 60 minutes at room temperature, and the specific reaction by each antibody was visualized using 3, 3'-diaminobenzidine. The slides were then counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated through graded ethanol, cleared in xylene, and mounted in slides with the help of Permount mounting media (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Negative controls were obtained by omission of the primary antibodies. The number of RANKL+ and OPG+ cells was obtained as described by TRAP+ cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using statistical software (BioEstat 3.0, Sociedade Civil Mimirauá, Tefé, AM, Brazil). Data were first examined for normality by the Kolmogorov-Smirnov test and, since the data did not achieve normality, analysis was performed using non-parametric methods. BL, TRAP+, RANKL+ and OPG+ cells were computed for each tooth and then averaged across unligated and ligated teeth in the experimental groups. BD were averaged across unligated teeth in the three experimental groups. The significance of differences among groups was sought using the Kruskal-Wallis test. If significance was detected, the Dunn's test was used to assess differences between two groups. In addition, the Wilcoxon test was used for intragroup comparisons between ligated and unligated teeth for BL. The significance level established for all analyses was 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

All animals gained weight during the study; however, the mean body weight did not show statistically significant differences among groups in the end of the experimental period. The final mean body weights were $307 \pm 54\text{g}$, $304 \pm 17\text{g}$ and $329 \pm 28\text{g}$ for NTR, Untreated SHR, and Treated SHR groups, respectively.

Histometric analysis

An intragroup significant difference in furcation BL between ligated and unligated teeth was observed among the three experimental groups, showing that the ligatures were able to induce bone loss. No statistically significant differences were found regarding BL in ligated teeth among groups ($p > 0.05$). The mean BL areas for the ligated teeth of NTR, Untreated SHR, and Treated SHR groups were $0.52 \pm 0.26 \text{ mm}^2$, $0.35 \pm 0.11 \text{ mm}^2$ and $0.35 \pm 0.10 \text{ mm}^2$, respectively (Figure 1A). On the other hand, significant greater areas between interradicular bone crest and furcation roof were observed in the unligated teeth of Untreated ($0.26 \pm 0.08 \text{ mm}^2$) and Treated SHR ($0.17 \pm 0.05 \text{ mm}^2$) when compared to NTR ($0.13 \pm 0.03 \text{ mm}^2$; $p < 0.05$). Figures 1B-1G illustrate the histological findings, showing a greater distance between bone crest and furcation roof of the unligated teeth of Untreated (Figure 1F) and Treated SHR (Figure 1G).

Bone densities were significantly lower in tooth-supporting alveolar bone from Untreated ($89.7 \pm 3.2\%$) and Treated SHR ($87.1 \pm 2.4\%$) groups when compared to NTR ($94.5 \pm 1.6\%$; $p < 0.05$; Figure 2). Figures 1E-1G illustrate the histological findings of BD, showing large trabecular spaces on tooth-supporting alveolar bone of Untreated (Figure 1F) and Treated SHR (Figure 1G).

TRAP staining

The number of TRAP+ cells was not significantly different among groups in the alveolar bone of ligated teeth (Figure 3A - 3D; $p > 0.05$). However, the analyses of the

unligated teeth demonstrated a higher number of TRAP+ cells in bone around unligated teeth from Untreated SHR compared to other groups (Figure 3E- 3H; $p < 0.05$).

Immunohistochemical analysis

Around ligated teeth, the number of RANKL+ cells was lower in Treated SHR than NTR and Untreated SHR groups (Figure 4A; $p < 0.05$). In the alveolar bone of unligated teeth, the number of RANKL+ cells was higher around Untreated SHR group when compared to other groups (Figure 4B; $p < 0.05$). The number of OPG+ cells was higher around ligated (Figure 4C) and unligated teeth (Figure 4D) of Untreated SHR when compared to Treated SHR ($p < 0.05$), although both SHR groups were similar to NTR ($p > 0.05$). There were no significant differences among groups (Figure 4E) regarding the number of RANKL/OPG+ cells ratio around ligated teeth ($p > 0.05$). On the other hand, the ratio of RANKL/OPG+ cells was highest in bone around unligated teeth of Untreated SHR group (Figure 4F; $p < 0.05$). Figures 5A-5C illustrate the immunohistochemical staining for RANKL around ligated teeth of NTR, Untreated and Treated SHR groups, respectively. Figures 5D-5F show the immunohistochemical staining for RANKL around unligated teeth of NTR, Untreated and Treated SHR groups, respectively. Figures 6A-6C present the immunohistochemical staining for OPG in bone around ligated teeth of NTR, Untreated and Treated SHR groups, respectively. Figures 6D-6F show immunohistochemical staining for OPG around unligated teeth of NTR, Untreated and Treated SHR groups, respectively

DISCUSSION

Besides the importance of alveolar bone in supporting the teeth, it is essential for successful rehabilitations of edentulous patients by dental implant and prostheses. Therefore, the recognition of systemic conditions and habits that could affect alveolar bone is important in order to identify groups with increased risk for poor alveolar bone quality and quantity.

Thus, the present study focused on impact of hypertension on alveolar bone under local healthy and inflammatory conditions, evaluating both ligature-induced bone loss and tooth-supporting bone quality in SHR animals. SHR is one of the most widely used genetic models of human essential hypertension, characterized as a counterpart for human disorder in relation to hemodynamic, endocrine and end-organ manifestations (Trippodo and Frohlich 1981). Among the therapies proposed to control hypertension, lercanidipine is a third-generation dihydropyridine calcium antagonist drug which presents prolonged receptor half-life and ability to sustain vasodilatation with minimal sympathetic activation and risk for peripheral edema and cardiovascular events (Borghi 2005; Makarounas-Kirchmann et al. 2009). It inhibits calcium influx through the L-type Ca^{2+} channel in vascular smooth muscle, disrupting the contraction process. Since bone cells express these channels, it is suggested that dihydropyridine-type calcium antagonist signaling through L-type Ca^{2+} channel could play role in bone metabolism (Nishiya and Sugimoto 2001). However, the impact of lercanidipine on bone tissues has not been investigated so far. Therefore, in the present study the possibility of lercanidipine treatment have some effect on alveolar bone of SHR was also assessed. It is important to emphasize that blood pressures were not recorded in this study since SHR is a well-established model of hypertension and previous studies have already confirmed that arterial pressure is higher in SHR than NTR (Izawa et al. 1985; Metz et al. 1990; Wang et al. 1993; Leite et al. 2005). In relation to anti-hypertensive treatment, Sabbatini et al. (2000) demonstrated that 2.5mg/kg body weight/day of lercanidipine is a hypotensive dose for SHR that is able to effectively reduced the systolic pressure after 3 weeks of treatment.

Tooth-supporting alveolar bone around teeth without ligature in Untreated SHR group presented higher expression of RANKL and ratio of RANKL/OPG, elevated number of TRAP+ cells, increased BL and decreased BD. Taken together, these results suggest that a hypertensive status may directly affect alveolar bone regardless of ligature challenge. Our

results from alveolar bone are in line with previous studies showing disorders in long bone of SHR when compared to NTR (Izawa et al. 1985; Barbagallo et al. 1990; Metz et al. 1990; Barbagallo et al. 1991; Inoue et al. 1995; Wright and DeMoss 2000). In addition, the experimental findings are in agreement with clinical investigations that have also showed association between low bone mineral density and high blood pressure (Cappuccio et al. 1999; Tsuda et al. 2001; Gotoh et al. 2005) and lower radiographic alveolar bone level in hypertensive compared to normotensive patients (Arendt and Elzay 1976). Different from our results, Leite et al. (2005) did not note differences in the alveolar bone around unligated teeth between SHR and NTR. Such conflicting results could be related to methodological divergences between both studies. One possible explanation by which hypertension may negatively affect bone may be the effect of angiotensin (Ang) II, the major mediator of the maintenance of extracellular fluid volume and blood pressure, on osteoblastic differentiation reduction and osteoclast activation increase (Hatton et al. 1997; Hagiwara et al. 1998; Shimizu et al. 2008). Shimizu et al. (2008) observed that Ang II directly induced RANKL expression in osteoblasts through Ang II type 1 receptor, leading to osteoclast activation. In addition, Ang II increases the number of TRAP+ cells.

It is worthy of note that SHR under continuous administration of lercanidipine presented a lower number of RANKL+ cells, ratio of RANKL/OPG+ cells as well as a decreased TRAP+ expression in the tooth-supporting alveolar bone around unligated teeth. These molecular findings revealed a role of lercanidipine in controlling bone resorption-related factors in SHR, although it was not noted histometric benefits of the drug when considering alveolar BD and BL. The disagreement between histometric and immunohistochemical/histochemical results might be, at least in part, due to differences in the accuracy of the assays employed to detect bone changes. However, as result of the observed molecular benefits of lercanidipine on alveolar bone, it could be speculated that

histometric benefits could be observed in a longer-term administration of the drug. Nevertheless, further studies will be necessary to clarify this issue.

Bone loss was not different between Treated and Untreated SHR groups and NTR group in the presence of ligature challenge, suggesting a predominant effect of local factor (i.e. plaque accumulation) rather than hypertension during the experimental period. In agreement with our results, Perlstein and Bissada (1977) did not find significant effect of hypertension on the severity of periodontitis in rats. In addition, one previous study also did not observe effect of nifedipine, a first-generation dihydropyridine calcium antagonist, on ligature-induced bone loss. However, it is important to note that the drug was administered in NTR (Gonçalves et al. 2003). On the other hand, the present results are in contrast with those from Leite et al. (2005), in which alveolar bone destruction was more intense in ligated teeth of SHR than NTR. Such contradictory results could be explained by differences in sample size, time of ligature exposure and parameters used to evaluate alveolar bone changes. Interestingly, bone around ligated teeth from Treated SHR presented a lower number of RANKL+ cells compared to other groups. Again, this result may suggest a trend of lercanidipine in controlling bone resorption even though the presence of a local inflammatory condition. However, further studies are required to elucidate the meaning of this molecular finding.

In conclusion, SHR presented harmful alterations in tooth-supporting bone quality independent of plaque accumulation. In addition, daily administration of lercanidipine during 6 weeks was able to decrease the expression of some bone resorption markers. Therefore, in addition to the systemic effects of hypertension, this condition may also have a significant influence on alveolar bone and, therefore, a direct impact on various clinical situations in dentistry.

REFERENCES

- Al-Emadi A, Bissada N, Farah C, Siegel B, Al-Zaharani M. Systemic diseases among patients with and without alveolar bone loss. *Quintessence Int* 2006;37:761-765.
- Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, Pellegrino RG, Pellegrino G, Prosciutti L, Giannoni C, Cianetti S, Bentivoglio M. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. *Hypertension* 2003;41:488-492
- Arendt DM, Elzay RP. Radiographic analysis of periodontal bone loss in hypertensive and normotensive patients. *Va Dent J* 1976;53:15-19.
- Barbagallo M, Raddino R, Restori G, Boiardi L, Novo S, Strano A. Alterations of calcium metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience* 1990;1:105- 107.
- Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience* 1991;2:15- 17.
- Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 2005;76(Suppl):2089-2100.
- Boos CJ, Lip GY. Elevated high-sensitive C-reactive protein, large arterial stiffness and atherosclerosis: a relationship between inflammation and hypertension? *J Hum Hypertens* 2005;19:511-513.
- Borghi C. Lercanidipine in hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1:173-182.

Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. *Study of Osteoporotic Fractures. Lancet* 1999;354:971-975.

Castelli WA, Diaz-Perez R, Nasjleti CE, Caffesse RG. Effect of renovascular hypertension on the morphology of oral blood vessels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46:576-582.

Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987;35:203-206.

De Nardin E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann Periodontol* 2001;6:30-40.

Gonçalves PF, Nogueira Filho Gda R, Sallum EA, Sallum AW, Nociti Júnior FH. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis--a study in rats. *Pesq Odontol Bras* 2003;17:46-50.

Gotoh M, Mizuno K, Ono Y, Takahashi M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertens Res* 2005;28:565-570.

Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 1998;156:543-550.

Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 2006;52:499-509.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71:1554-1560.

Hassumi MY, Silva-Filho VJ, Campos-Júnior JC, Vieira SM, Cunha FQ, Alves PM, Alves JB, Kawai T, Gonçalves RB, Napimoga MH. PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1150-1158.

Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 1997; 152:5-10.

Holmlund A, Holm G, Lind L. Severity of periodontal disease and number of remaining teeth are related to the prevalence of myocardial infarction and hypertension in a study based on 4,254 subjects. *J Periodontol* 2006;77:1173-1178.

Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995;22:S242-243.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int* 1985;37:605-607.

Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens* 2008;26:381-391.

Leite CL, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2005;27:523-531.

Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee WS. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec* 1997;249:173-180.

Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*. 1994;90:2056-69.

Makarounas-Kirchmann K, Glover-Koudounas S, Ferrari P. Results of a meta-analysis comparing the tolerability of lercanidipine and other dihydropyridine calcium channel blockers. *Clin Ther* 2009;31:1652-1663.

McCarron DA, Pingree PA, Rubin RJ, Gaucher SM, Molitch M, Krutzik S. Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak. *Hypertension* 1980;2:162-168.

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 ;292:C82-97.

Metz JA, Karanja N, Young EW, Morris CD, McCarron DA. Bone mineral density in spontaneous hypertension: differential effects of dietary calcium and sodium. *Am J Med Sci* 1990;300:225-230.

Mussolino ME, Gillum RF. Bone mineral density and hypertension prevalence in postmenopausal women: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Ann Epidemiol* 2006;16:395-399.

Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull* 2001;24:628-633.

Oshima T, Young EW. Systemic and cellular calcium metabolism and hypertension. *Semin Nephrol*. 1995;15:496-503.

Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;43:707-719.

Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, Amenta F. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:948-954.

Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J* 2008; 22:2465-2475.

Strazzullo P, Trevisan M, Farinaro E, Cappuccio FP, Ferrara LA, de Campora E et al. Characteristics of the association between salt intake and blood pressure in a sample of male working population in southern Italy. *Eur Heart J* 1983;4:608-613.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981;48:309-319.

Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:704-707.

Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4:971-81.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif Tissue Int* 2009;84:103-111.

Vidal F, Figueredo CM, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *J Periodontol* 2009; 80:786-791.

Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* 1993;20:251-264.

Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism* 2000;49:1130-1133.

Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009;2:56-64.

Young EW, McCarron DA, Morris CD. Calcium regulating hormones in essential hypertension. Importance of gender. *Am J Hypertens* 1990;3:161S- 166S.

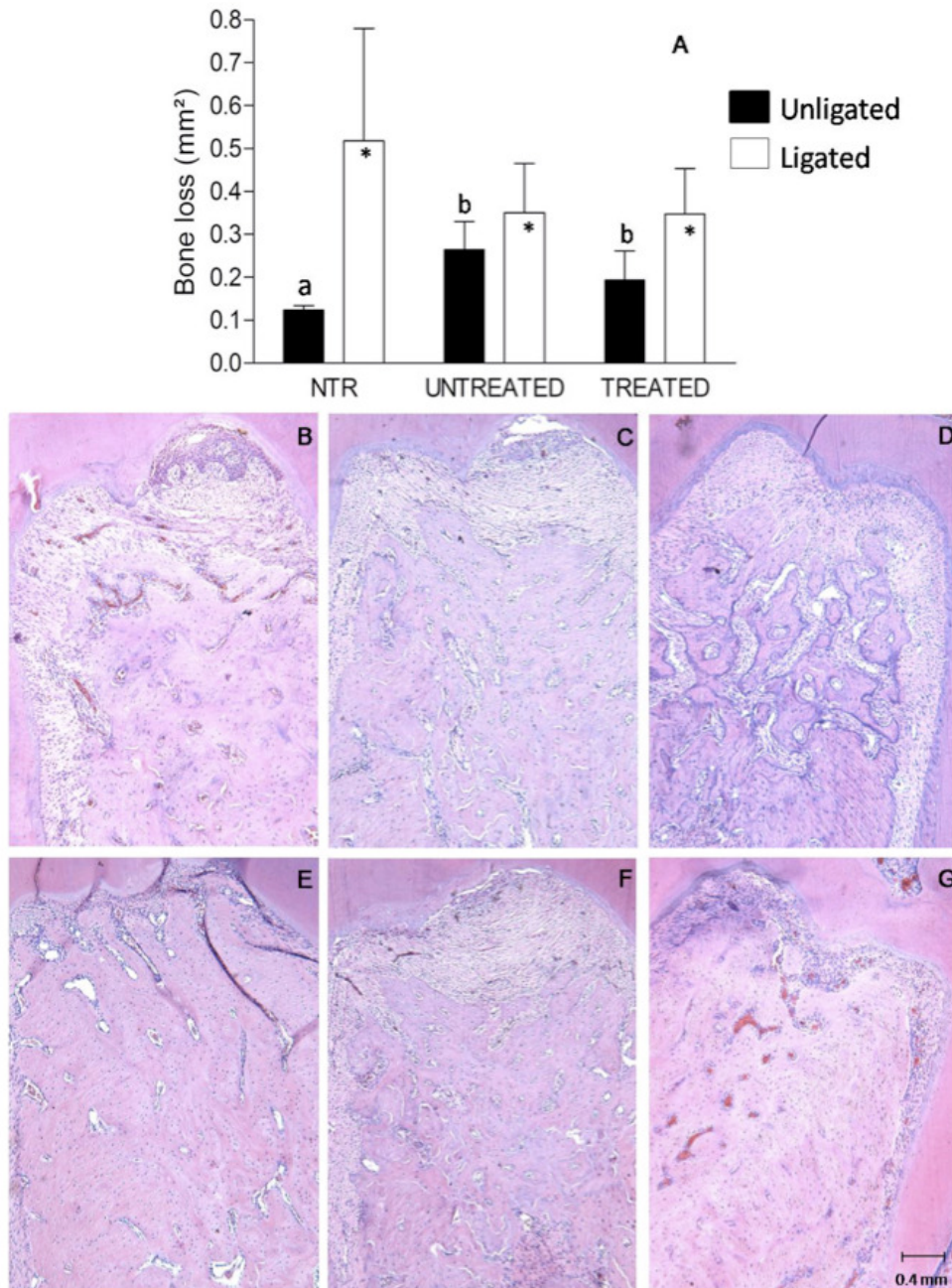


Figure 1. (A) Means and standard deviations of the area between interradicular bone crest and furcation roof (BL/mm²) for unligated and ligated teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR groups. Photomicrographs illustrating the area between interradicular bone crest and furcation roof of ligated (B-D) and unligated (E-G) teeth of NTR, Untreated SHR and

Treated SHR (x40 magnification). * Differences between ligated and unligated teeth ($p < 0.05$; Wilcoxon test); a,b Differences among groups ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis and Dunn's tests).

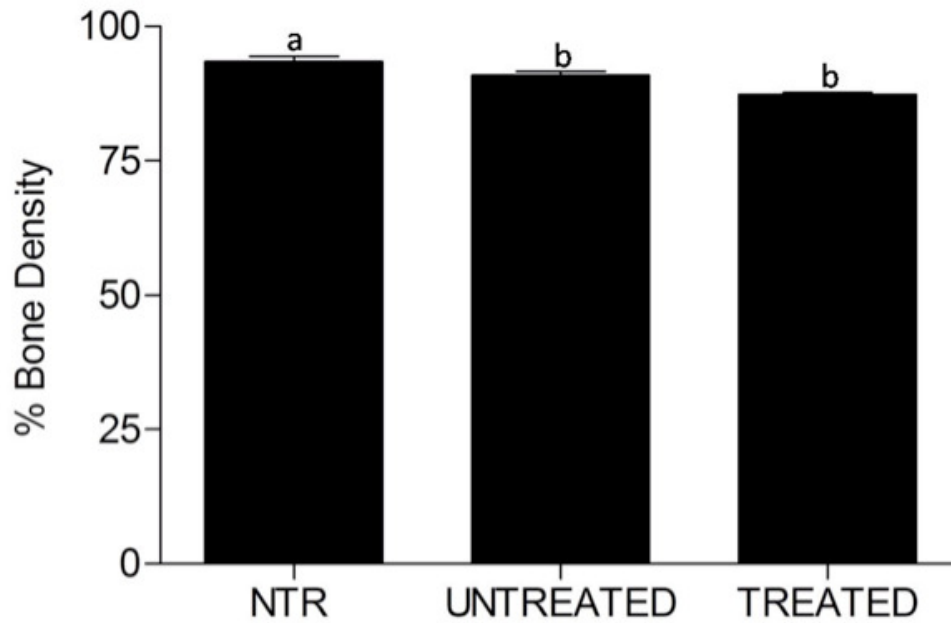


Figure 2. Means and standard deviations of tooth-supporting alveolar bone density of (BD, %) of NTR, Untreated SHR and Treated SHR groups; a,b Differences among groups ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis and Dunn's tests).

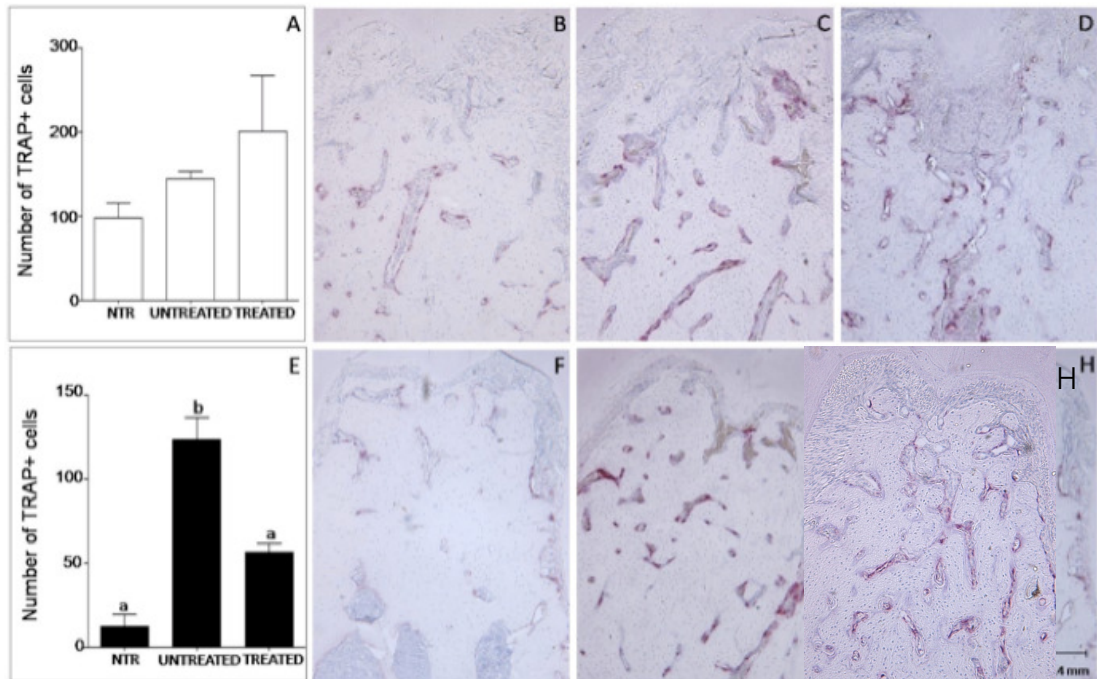


Figure 3. Means and standard deviations of the number of TRAP+ cells in a 300 μ m zone under the top of the bone crest for ligated (A) and unligated (E) teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR groups; Photomicrographs illustrating TRAP+cells around ligated (B-D) and unligated (F-H) teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR (x40 magnification). a,b Differences among groups ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis and Dunn's tests).

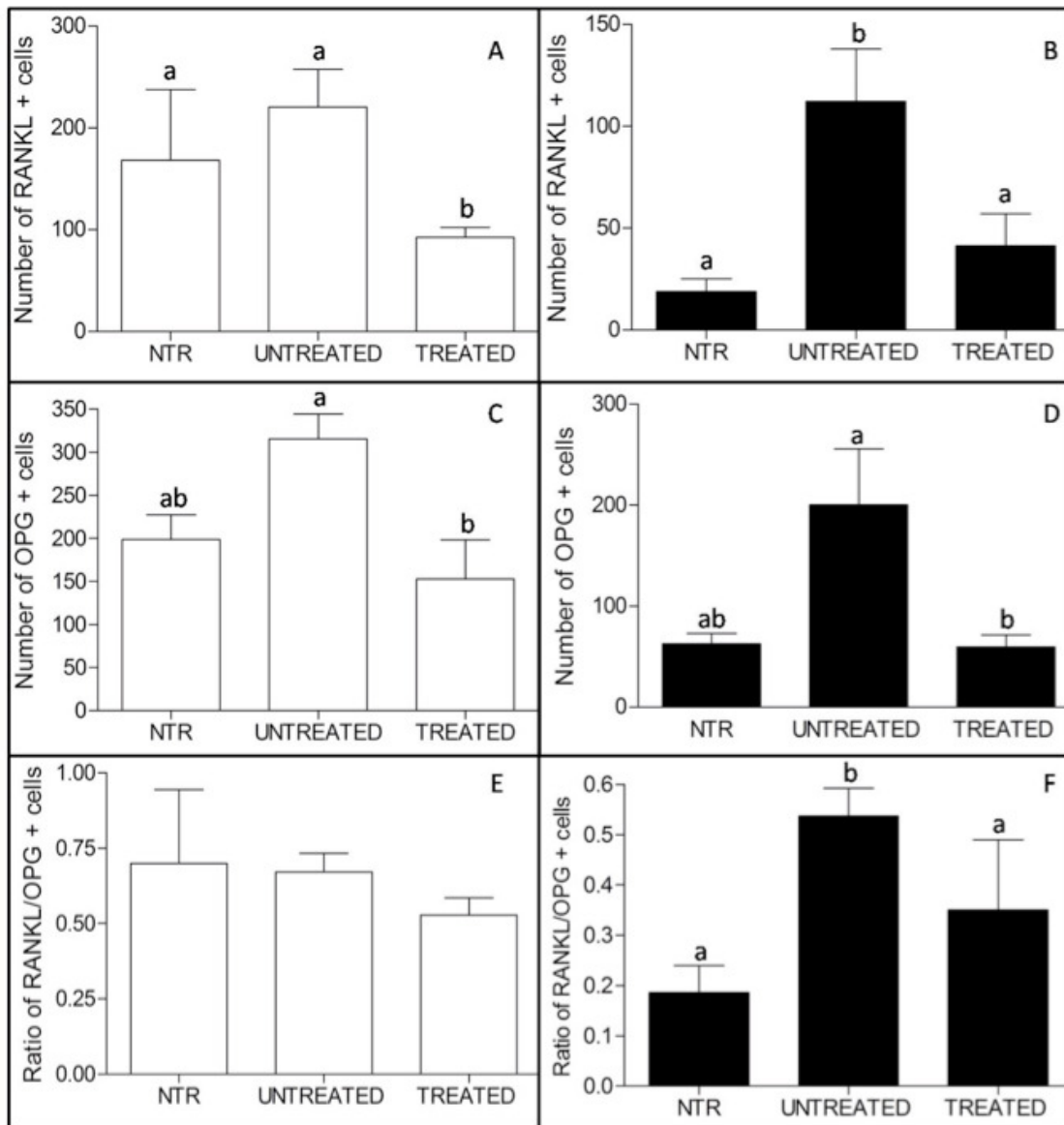


Figure 4. Means and standard deviations of RANKL+ cells (A), OPG+ cells (C) and RANKL/OPG+ cells ratio (E) in a 300µm zone under the top of the bone crest around ligated teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR; Means and standard deviations of RANKL+ cells (B), OPG+ cells (D) and RANKL/OPG+ cells ratio (F) in a 300µm zone under the top of the bone crest around unligated teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR; a,b Differences among groups ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis and Dunn's tests).

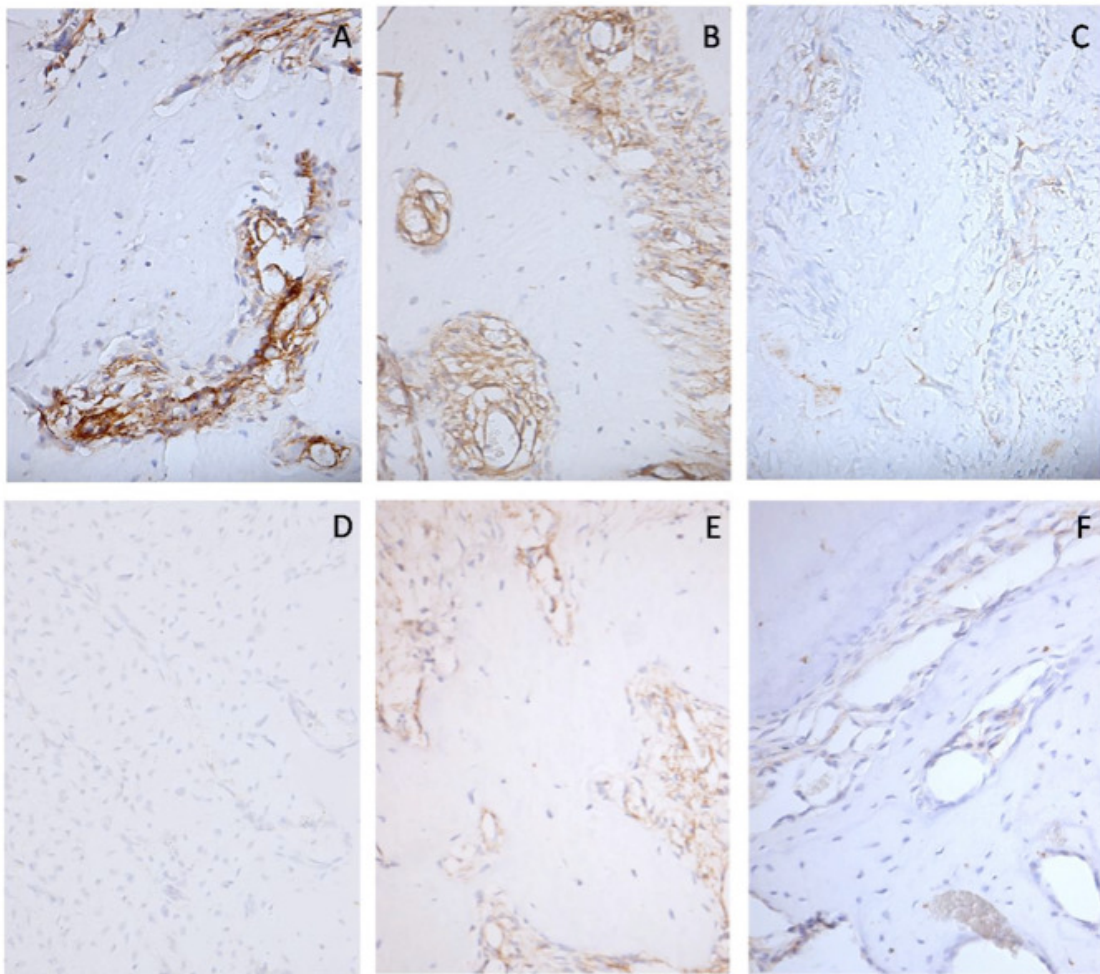


Figure 5. Photomicrographs illustrating immunohistochemical staining for RANKL around ligated (A-C) and unligated (D-F) teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR, respectively. Note the low number of cells staining for RANKL in bone around the ligated molar of a Treated SHR section (C) and a high number of cells staining for RANKL around a unligated teeth of Untreated SHR section (E) (x400 magnification).

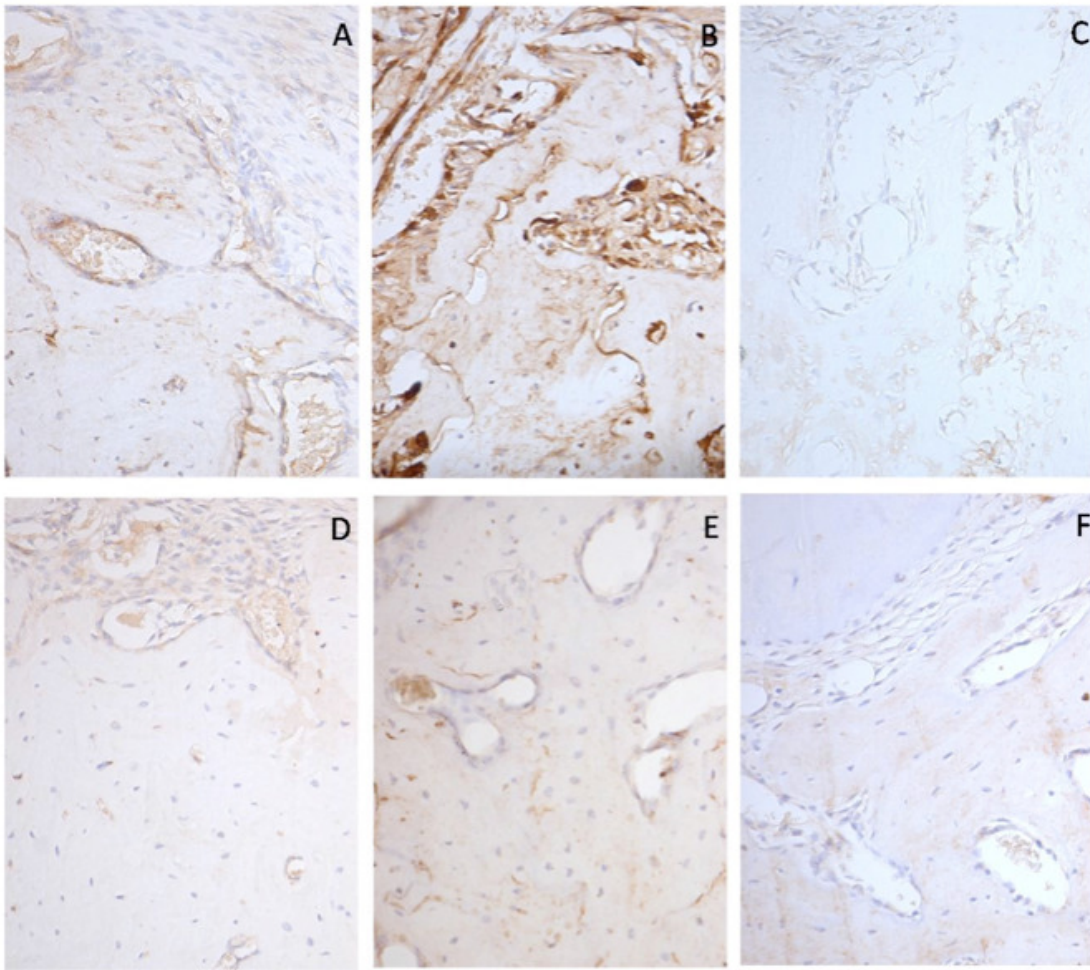


Figure 6. Photomicrographs illustrating immunohistochemical staining for OPG around ligated (A-C) and unligated (D-F) teeth of NTR, Untreated SHR and Treated SHR, respectively. A high number of cells staining for OPG can be observed in bone around both ligated (B) and unligated (E) teeth of Untreated SHR group (x 400 magnification).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo utilizando o modelo SHR sugere que a hipertensão pode gerar perda e diminuição da qualidade do osso alveolar, independentemente do desafio da ligadura. A administração diária de lercanidipine durante 6 semanas, foi capaz de diminuir a expressão de marcadores de reabsorção óssea como RANKL e TRAP, porém estes resultados não se refletiram nos parâmetros histométricos. Esses resultados sugerem que, além dos efeitos sistêmicos, a hipertensão arterial pode ter uma influência negativa sobre o osso alveolar e, portanto, um impacto direto em diversas situações clínicas em odontologia, especialmente em implantodontia e reabilitações protéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2002;29:177-6.

Allhat officers and coordinators. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (Allhat). *Jama*. 2002;288:2981–7.

Al-Zahrani MS, Borawski EA, Bissada NF. Periodontitis and three health-enhancing behaviors: normal weight, recommended level of exercise and high-quality diet. *J Periodontol*. 2005;76:1362-6

Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Dyke T, Vita J. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1245-9.

American academy of Periodontology. Position paper: The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999;70: 457-0.

Andresen MC, Krauhs JM, Brown AM. Relationship of aortic wall and baroreceptor properties during development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1978;43:728-8.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A TNF homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390:175-9.

Arendt M, Elzay R. Radiographic analysis of periodontal bone loss in hypertensive and normotensive patients. *Va Dent J.* 1976;53:15-9.

Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol* 1996;1:37-5.

Bainbridge A, Macfadyen R, Lees K, Reid J. A study of the acute pharmacodynamic interaction of ramipril and felodipine in normotensive subjects. *Br J clin Pharmacol.* 1991; 31:148-3.

Bakris G, Sowers J, Ferdinand K. Blood pressure control in the patient with difficult-to-control hypertension: which agent for which patient? *Prev Cardiol.* 2008;1:42-9.

Binggeli C, Corti R, Sudano I, Luscher T, Noll G. Effects of chronic calcium channel blockade on sympathetic nerve activity in hypertension. *Hypertension.* 2002;39:892-6.

Borghi C. Lercanidipine in hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1:173-2.

Broulik PD, Tesar V, Zima T, Jirsa M. Impact of antihypertensive therapy on skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. *Physiol Res.* 2001; 50:353-8.

Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature.* 2000;407:870-6.

Brown AM, Saum WR, Tuley FH. A comparison of aortic baroreceptor discharge in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 1976;39:488-6.

Brown AM. Receptors under pressure. An update on baroreceptors. *Circ Res.* 1980;46:1-0.

Bunda S, Wang Y, Mitts T, Liu P, Arab S, Arabkhari M, Hinek A. Aldosterone stimulates elastogenesis in cardiac fibroblasts via mineralocorticoid receptor-independent action

involving the consecutive activation of galpha13, c-Src, the insulin-like growth Factor-1 receptor, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem.* 2009;284:16633-47.

Connell J, Davies E. The New Biology of Aldosterone. *Journal of Endocrinology.* 2005; 186:1-0.

Danser H, Batenburg W, Van J, Krop M. Prorenin anno. *J Mol. Med.*2008; 86:655-8.

Engström S, Gahnberg L, Högberg H, Svärdsudd K. Association between high blood pressure and deep periodontal pockets. A nested case-referent study. *Upsala J Med Sci.* 2007;112:95-3.

DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Willianson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 1993;306: 688-1.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996;67:1041-9.

Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T . Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glcated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997; 68:713-9.

Guyton AC, Coleman TG, Fourcade JC, Navar LG. Physiologic control of arterial pressure. *Bull N Y Acad Med.* 1969; 45:811-0

Guyton AC. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. *Science.* 1991; 252(5014):1813-6.

Habermann B, Eberthardt C, Feld M, Zichner L, Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop.* 2007;78:221-5.

Hardy B, Bartle W, Myers M, Bailey D, Edgar B. Effect of indomethacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine. *Br J clin Pharmacol*. 1988; 26: 557-2.

Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Soga J, Chayama K, Yoshizumi M, Taguchi A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*. 2008; 51: 446-3.

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41:218-3.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone disease. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126:145-0.

Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama*. 2004;292:490-5.

Holmstrup P, Poulsen AH, Andersen L, Skuldbol T, Fiehn NE. Oral infections and systemic diseases. *Dent Clin North Am*. 2003; 47:575-8.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 377:239-2.

Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What Is the difference of bone growth in SHR and SD rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995; 22:242-3.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocri.* 2001; 142:1419-6.

James MN, Sielecki AR. Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinase penicillopepsin. *Bioche.* 1985;24:3701-3.

Jennings D, Kalus J, O'Dell K. Aldosterone receptor antagonism in heart failure. *Pharmacoth.* 2005; 25:1126-3.

Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today.* 2000;21:495-2.

Lang P, Smith F. Lymphocyte response to T-Cell mitogen during experimental gingivitis in humans. *Infect Immun.* 1976;1: 108-3.

Larijani B, Bekheirnia M, Soltani A, Khalili-Far A, Adibi H, Jalili R. Bone mineral density is related to blood pressure in men. *Am J Of Hum Biol.* 2004; 16:168–1.

Leibbrandt A, Penninger J. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1143: 123–0.

Leite C, Redins C, Vasquez E, Meyrelles S. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hyperten.* 2005; 6:523–1.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85: 596-7.

Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee W. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec.* 1997: 249:173–0.

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. [Molecular mechanisms of human hypertension](#). Cell. 2001;104:545-6.

Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. Circulation. 1994;90:2056-9.

Ma Y, Stimpel M, Liang H, Pun S, Jee W. Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of moexipril and hydrochlorothiazide on osteopenia in spontaneously hypertensive ovariectomized rats. Journal of Endocrinology. 1997; 154:467-4.

MacGregor GA, Cappuccio FP. [The kidney and essential hypertension: a link to osteoporosis?](#) J Hypertension. 1993; 11:781-5.

Makarounas-Kirchmann K, Glover-Koudounas S, Ferrari P. Results of a meta-analysis comparing the tolerability of lercanidipine and other dihydropyridine calcium channel blockers. Clin Ther. 2009 ;31:1652-3.

Massicotte J, Viens A, Yao M, Leonardi A, Sironi G, Wang H, Dumont .Effects of lercanidipine on coronary reactivity and myocardial remodeling in transition to heart failure in cardiomyopathic hamsters. Acta Pharmacol Sin. 2003; 24 : 199-6.

Matilla MJ, Montiel M, Jiménez E. [Angiotensin II \(AII\) and adrenal gland AII receptors in rats with congenital hypothyroidism](#). J Endocrinol. 1993; 137:231-8.

McCarron DA. [Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension](#). N Engl J Med. 1982;307:226-8

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:82-7.

Ménard J, Guyene TT, Peyrard S, Azizi M. Conformational changes in prorenin during renin inhibition in vitro and in vivo. *J Hypertens*. 2006; 24:529-4.

Metz J, Karanja N, Young E, Morris C, McCarron D. Bone mineral density in spontaneous hypertension: differential effects of dietary calcium and sodium. *Am J Med Sci*. 1990; 300:225-0.

Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of Various Antihypertensive Drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull*. 2001; 24:628-3.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27:282-3.

Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1986;13:345-9.

Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2006; 106:286-8.

Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int*. 1994; 46:1522-4.

Roberts HC, Knott L, Avery NC, Cox TM, Evans MJ, Hayman AR. Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: a role for TRAP in bone collagen metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80:400-0

Page RC, Schroeder HE. [Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work](#). *Lab Invest*. 1976;34:235-9.

Papapanou PN, Lindhe J, Sterrett JD, Eneroth L. Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *J Clin Periodontol*. 1991 Sep;18:611-5.

Rocha R, Funder J. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 970:89-0.

Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol.* 1998; 69:841-0.

Shimizu H, Nakagami H, Osako M, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *Faseb J.* 2008; 22:2465-5.

Silveira NP, Moreira ED, Drager LF, Silva GJ, Krieger EM. Effects of sinoaortic denervation on hemodynamic parameters during natural sleep in rats. *Sleep.* 2008; 31: 328-3.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309-9.

[Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME](#). Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. [Med Sci Monit.](#) 2000; 6:875-1.

Soysa NS, Alles N. NF Kappa Beta functions in osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378:1-5.

Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* 2003 ; 9:1506-2.

Trippodo N, Frohlich E. [Similarities of genetic \(spontaneous\) hypertension. Man and rat.](#) *Circ Res.* 1981;48:309-9.

Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The rennin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4:971-1.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12:17-5.

Wang T, Hsu J, Jee W, Matthews J. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bon and Min.* 1993; 20:251-4.

Wirtz S, Herzig S. Molecular mechanisms of vasoselectivity of the 1,4-dihydropyridine lercanidipine. *Br J Pharmacol.* 2004; 142:275-4.

Wright G, Demoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism.* 2000; 49:1130-3.

Wright HL, McCarthy, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009; 2:56-4.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science.* 2002 Jan 18;295:505-8.