

LEONARDO BELINI

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na expressão de
TGF- β em ratos espontaneamente hipertensos submetidos à
doença periodontal. Papel dos mastócitos.**

Araçatuba – SP

2011

LEONARDO BELINI

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na expressão de
TGF- β em ratos espontaneamente hipertensos submetidos à
doença periodontal. Papel dos mastócitos.**

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”.

Orientador: Profa. Adj. Sandra Helena P.
de Oliveira PhD

Araçatuba – SP

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Édis e Iris, por acreditarem em mim e em meus sonhos, pelo amor e responsáveis por tudo que sou hoje. Aos meus irmãos Glaucia e Júnior, pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela minha existência e por iluminar todos os meus passos.

Aos meus pais, Édis Belini e Iris M.S.Belini, meus exemplos de vida, sempre presentes, me dando forças e por terem apoiado nas minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Glaucia Cristina Belini Chaves e Edis Belini Junior, pelo carinho, respeito e admiração. Ao meu cunhado Luis A. F. Chaves, e a minha cunhada, Juliana R. G. Belini pelos momentos de alegria, diversão e descontração.

Á minha namorada Isis Ap. Gonçalves pela paciência, companheirismo, amor, compreensão e pelos momentos felizes que juntos compartilhamos.

Á minha sobrinha e afilhada Ana Laura Belini Chaves, sua chegada trouxe muitas felicidades!

Á minha grande família, que me incentivaram e torceram para que eu chegasse até aqui, agradeço muito a todos eles.

Aos meus amigos, e em especial Maurício H. Shimada (Sobá), Guilherme Bergamo B. de Oliveira (Hanso), Adriano Peres B. Ramos (Tatu) e Samuel R. L. Morais, por ser minha família em Araçatuba, que sempre deram forças para prosseguir na luta.

À minha Orientadora Sandra Helena Penha de Oliveira, pela orientação, ensinamento, apoio, amizade, carinho, por participar ativamente na minha formação profissional, ser a protagonista desta minha conquista e, principalmente, pela paciência que teve comigo. Sempre serei grato por tudo isso. Serei sempre um grande admirador de sua pessoa.

A FAPESP pela minha bolsa de estudos.

Ao grupo do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, onde desenvolvi meu projeto, com o apoio dos estagiários, técnicos e pós-graduandos, e em especial pessoas que acabaram tornando amigos Daniel, Isabelle, Vanessa, Samuel, Ariane, Caril, Renato, Elisa. Muito obrigado pelo apoio e carinho de vocês.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, que sempre me receberam muito bem, e me auxiliaram na pesquisa.

Aos Funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por fornecer animais para o desenvolvimento da pesquisa.

À Prof^a Ass. Dr.^aLeda Maria Pescinini Salzedas e Prof. Adj. Dr. Cláudio Aparecido Casatti, pela disposição da atenção e do tempo, para auxiliarme na pesquisa.

EPIGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

“

BELINI, L. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na expressão de TGF- β em ratos espontaneamente hipertensos submetidos à doença periodontal. Papel dos mastócitos.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel dos mastócitos sobre os níveis de reabsorção óssea (RO), migração de neutrófilos (MN), produção de CINC-2, TGF- β , colágeno tipo I e NOSi no tecido gengival (TG) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar (W) (180-200g) submetidos a doença periodontal (DP). Para tanto, animais foram depletado de MAST pelo tratamento com composto 48/80 (48/80), i.p, sendo esse administrado no 1º dia, em duas doses de 0.6 mg/kg, no 2º e 3º dias, em duas doses de 1.2 mg/kg e no 4º dia em duas doses de 2,4 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses). No 5º dia foi realizada a ligadura dos primeiros molares homólogos com fio de seda para indução da DP. A indução da DP também foi realizada nos animais que não foram tratados com o 48/80. Após 7 e 14 dias, foram coletados os TG para a dosagem de CINC-2 e TGF- β por ELISA e avaliamos a expressão de colágeno tipo I e NOSi por RT-PCR, a MN pelo nível da enzima mieloperoxidase (MPO), e as mandíbulas foram radiografadas para a avaliação dos níveis de RO pelo programa *Digora*. Observamos que a DP foi efetiva, pelo nível de RO avaliado em todos os animais com DP. A presença dos MAST diminuiu a RO apenas em animais SHR 14 dias após a indução da DP. A MN para o TG nos animais SHR com DP foi maior quando comparados com os animais W com DP, tanto 7 quanto 14 dias após a indução da doença. Esta migração foi diminuída em animais SHR depletados de MAST, mas não em animais W. Os níveis de CINC-2 tende a aumentar em W e os animais SHR, na presença de DP. CINC-2 está aumentado na ausência de MAST em SHR e W 7 dias após a indução da DP. Em animais com 14 dias de indução, SHR com PD mostraram um aumento significativo sobre o controle. A expressão de TGF- β aumentou principalmente em animais SHR 7 e 14 dias após a indução da doença, sendo mais expressivo no período de 14 dias, e a ausência do MAST diminuiu a expressão de TGF- β em SHR 7 dias após a indução da doença e não alterou 14 dias após. Quando comparamos a expressão de colágeno tipo I pelo TG observamos que o aumento da expressão de TGF- β favorece ao aumento da expressão da síntese de colágeno. A expressão da enzima

NOSi já apresentou-se elevada em animais W e SHR sem a doença. A DP foi capaz de reduzir a expressão em animais W e aumentou ligeiramente em animais SHR. Na ausência dos MAST houve uma maior redução da expressão da enzima. Tomados em conjunto, nossos estudos mostram que o pico da resposta inflamatória foi 7 dias após a DP e da RO ocorreu 14 dias após, sendo maior em animais SHR. O MAST apresenta uma resposta dual sobre os parâmetros analisados, sendo que todas as respostas estão potenciadas em animais SHR.

Palavras- chave= Doença periodontal; Hipertensão; Mastócitos; Mieloperoxidase; CINC-2; TGF- β ; colágeno tipo I; NOSi

BELINI, L. **Evaluation of the mechanisms involved in TGF- β in spontaneously hypertensive rats subjected to periodontal disease. Role of mast cells.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of mast cells on the levels of bone resorption (BR), neutrophil migration (NM), production of CINC-2, TGF- β , collagen type I and iNOS in gingival tissue (GT) spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar (W) (180-200g) underwent periodontal disease (PD). For this, animals were depleted of MAST by treatment with compound 48/80 (48/80), ip, and this is administered on day 1, two doses of 0.6 mg / kg at 2 and 3 days in two doses of 1.2 mg / kg and on day 4 in two doses of 2.4 mg / kg (range 12h between doses). On day 5 was ligated first molars counterparts with silk thread for the induction of PD. The induction of PD was also performed in animals that were not treated with the 48/80. After 7 and 14 days, TG were collected for the measurement of CINC-2 and TGF- β by ELISA and evaluated the expression of collagen type I and iNOS by RT-PCR, the NM by the level of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and the mandibles were radiographed to assess the levels of RO the program Digora. We observed that the DP was effective, the level of RO evaluated in all animals with PD. The presence of MAST RO decreased only in SHR 14 days after induction of PD. NM for the TG in SHR with PD was higher when compared with W animals with PD, both 7 and 14 days after disease induction. This migration was decreased in MAST-depleted SHR but not in animals W. The levels of CINC-2 tends to increase in W and SHR in the presence of PD. CINC-2 is increased in the absence of MAST in SHR and W 7 days after induction of PD. In animals with 14 days of induction, SHR with PD showed a significant increase over the control. The expression of TGF- β increased mainly in SHR 7 and 14 days after induction of disease, being more expressive in 14 days, and the absence of MAST decreased the expression of TGF- β in SHR 7 days after induction of disease and did not change after 14 days. When comparing the expression of type I collagen observed by TG that increased expression of TGF- β promotes the increased expression of collagen synthesis. The expression of iNOS

enzyme already showed high in W and SHR animals without the disease. PD was able to reduce expression in W animals and increased slightly in SHR. In the absence of MAST was a further reduction of enzyme expression. Taken together, our studies show that the peak inflammatory response was 7 days after PD and RO occurred 14 days after being higher in SHR. The MAST has a dual response on the parameters analyzed, and all responses are potentiated in SHR.

Keywords = Periodontal disease; Hypertension; Mast cells; Myeloperoxidase; CINC-2, TGF- β , collagen type I, iNOS

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	12
3. Proposição.....	18
4. Metodologia.....	20
5. Resultados.....	28
6. Discussão e Conclusão.....	46
Referências.....	50
Anexo.....	56

1 INTRODUÇÃO

A periodontite e a doença cardiovascular são processos crônicos bastante freqüentes na população adulta. A doença periodontal pode ser considerada um potente fator de risco para as doenças cardiovasculares, através de mecanismos bacterianos orais, toxinas bacterianas, e a indução de mediadores inflamatórios. Essas substâncias, em quantidades elevadas, favorecem a reabsorção óssea bem como a maior destruição do ligamento periodontal por induzir modificações da atividade e expressão de fatores de crescimento e citocinas, que são responsáveis pela cicatrização. Além disso, também, entram na circulação sangüínea contribuindo para a cronificação da doença vascular sistêmica, que se dá com a agregação plaquetária, adesão e vasculites, com a subsequente deposição de colesterol e eventos tromboembólicos. A infecção bacteriana que afeta a gengiva por acúmulo de placa bacteriana durante a periodontite induz uma resposta inflamatória ao hospedeiro provocando o dano tecidual, conseqüentemente resultando na ativação das células imunes. Os mastócitos apresentam um papel crítico no desenvolvimento da inflamação da mucosa oral e da polpa dental por liberar mediadores pré-formados e sintetizados durante a inflamação. Assim, a regulação da sua ativação pode servir como uma ferramenta terapêutica eficaz para o controle do processo inflamatório. Desse modo, o objetivo principal do presente estudo será investigar o papel dos mastócitos nos mecanismos envolvidos na expressão de TGF- β pelo tecido gengival de ratos espontaneamente hipertensos

2 REVISÃO DE LITERATURA

Doença periodontal

Entre os processos patológicos que afetam a dentição humana, as doenças periodontais são umas das mais comumente observadas. Essas doenças compreendem um grupo de lesões que afetam os tecidos periodontais de proteção (gengiva), denominando-se gengivite, e de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), denominando-se periodontite, levando à perda dentária (Flemmig, 1999).

A principal causa da doença periodontal é a massa de bactérias (isto é, biofilme dental), principalmente anaeróbicas gram-negativas, que se acumula sobre a superfície dentária, ao nível e abaixo da margem da gengiva. Este acúmulo causa inflamação, levando à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar – os tecidos de sustentação de dente. Com a progressão da doença, os tecidos moles separam-se da superfície do dente resultando na lesão característica da periodontite crônica – a bolsa periodontal. A destruição tecidual pode levar à perda do dente, sendo a periodontite a causa mais comum de perda dentária nos indivíduos com idade superior a 35 anos (Wilson, 1995; Baelum et al., 1996; Van Dyke & Serhan, 2003).

Além disso, novas evidências científicas vêm sugerindo que especialmente as periodontites podem aumentar o risco de certas doenças sistêmicas, tais como as cardiopatias, recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso, doenças respiratórias, doenças coronárias, entre outras (Genco & Loe, 1993; Johnson- Leong et al., 2003; Jin et al., 2003). Vários componentes do sistema imune são ativados na doença periodontal. A interação entre os microorganismos e as células gengivais do hospedeiro culmina na formação de moléculas que participam do controle da resposta imune e inflamatória (Wahe, 1982).

Os lipopolissacarídeos (LPS), uns dos principais componentes das membranas mais externas das bactérias gram-negativas e considerado fator importante na patogênese da doença periodontal são encontrados adsorvidos às superfícies dentárias radiculares e aos tecidos gengivais de pacientes com doença

periodontal (Mayrand & Holt, 1988). Por suas ações sobre as células ósseas, o LPS pode estimular a reabsorção óssea e inibir sua formação, resultando em destruição do osso alveolar que sustenta o dente (Wilson, 1995). Ademais, os LPS podem ativar fibroblastos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares do hospedeiro para a secreção de citocinas pró-inflamatórias como: fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-1 β (Jandinski, 1991). Segundo dados de literatura, citocinas IL-1, IL-6 e o TNF- α , estimulam a reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo*, além disso, a IL-1 pode agir sobre fibroblastos promovendo reparo ou destruição da matriz celular. Além das citocinas acima descritas, IL-2, IL-4, IL-5, e IL-10 também são produzidas e podem ser responsáveis pela potencialização do processo inflamatório no periodonto. Essas moléculas são responsáveis pela regulação da atividade das células T e B. Os linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos variam em número, dependendo da condição da doença nos tecidos. Os anticorpos locais e sistêmicos para as bactérias bucais e o complemento também são significantes. Essas variáveis do hospedeiro podem influenciar a colonização e invasão bacteriana, destruição tecidual, cicatrização e fibrose (Myers, 1991). Portanto, existem consideráveis evidências implicando o LPS na patogênese da periodontite crônica, sendo que a resposta do hospedeiro pode contribuir para o processo da doença ou ainda modular a ação das bactérias envolvidas (Nisengard, 1997).

A resposta inflamatória consiste na primeira linha de defesa contra um agente agressor. Ela faz parte de uma imunidade inata, não específica onde às mesmas reações ocorrem sempre, independentes do tipo de agente agressor. Esta resposta envolve alterações vasculares, células responsáveis pelo combate do agente agressor e uma miríade de mediadores químicos, tais como leucotrienos, citocinas, quimiocinas e intermediários relativos do oxigênio e do hidrogênio, esses mediadores são importantes na amplificação e perpetuação da resposta inflamatória e apresentam os principais fatores associados à destruição periodontal (Brunetti, 2004).

As quimiocinas CXC são poderosos mediadores para indução de recrutamento de polimorfonucleares. Um membro representativo da classe CXC é a IL-8, a qual é quimiotática para polimorfonucleares em humanos (Oppenheim et al. 1991; Wirthlin and Hussain 1992). Em ratos, não foi identificado homólogo a IL-8. Até

agora, quatro quimiocinas CXC, incluindo CINC (ou CINC-1), CINC-2 α , CINC-2 β , e de MIP-2 (ou CINC-3), têm sido identificadas em rato (Nakagawa et al. 1994; Driscoll et al. 1995; Shibata et al. 1996). Eles são estruturalmente relacionados entre si e partilham muitas funções. Tem sido demonstrado que eles têm uma capacidade de atrair polimorfonucleares (PMN) e têm efeitos sobre outras funções, incluindo expressão de moléculas de adesão, influxo de cálcio intracelular, e fagocitose (Nakagawa et al. 1994).

Dados de literatura demonstram que a CINC-2 está presente no tecido periodontal de ratos sugerindo que esta quimiocina estaria induzindo recrutamento de PMN em direção ao patógeno podendo ter um papel importante na iniciação da inflamação e subsequente destruição do tecido periodontal (Miyachi et al. 2004). Dessa forma, investigar o papel da CINC-2 no processo inflamatório do periodonto em animais hipertensos poderia colaborar para a diminuição do processo e/ou interação dessas citocinas com proteínas da matriz

Doença Periodontal e Doença cardiovascular

A doença periodontal pode ser considerada um potente fator de risco para as doenças cardiovasculares, através de mecanismos bacterianos orais, toxinas bacterianas e a indução de mediadores inflamatórios. Estes mediadores entram no fluxo sanguíneo e contribuem para a cronificação da doença vascular sistêmica, (Garcia et al, 2001) que se dá com a agregação plaquetária, adesão e vasculites, com a subsequente deposição de colesterol e eventos tromboembólicos. Outra possibilidade, é que a inflamação causada pela doença periodontal induz a infiltração de células inflamatórias em vasos maiores, à proliferação do músculo liso vascular, à degeneração gordurosa e o aumento do acúmulo plaquetário, aos quais contribuem para a formação de edema e espessamento das artérias (DeStefano et al, 1993).

Apenas alguns estudos avaliaram a associação entre a doença periodontal e doenças cardiovasculares (DCV). Uma visão geral mostrou que 15% destes estudos apresentam uma associação entre DCV e doença periodontal (Armitage,

2000). Para definir os mecanismos subjacentes de tal associação, foram examinados: ligação potencial entre a doença periodontal e fatores de risco cardiovascular incluindo o diabetes, fumo, hiperlipidemia, e hipertensão. Surpreendentemente, apesar dos elevados números de casos de hipertensão na população geral e em sua importância prognóstica, poucos dados estão disponíveis relacionando elevada pressão sanguínea e a doença periodontal (Castelli et al, 1978). De acordo com esses estudos, o estado crônico e intenso da inflamação local (periodontite), resulta na presença de mediadores da inflamação na circulação podendo assim iniciar ou exacerbar a DCV (Beck et al, 1999). Estudo feito com humanos, descreveu as manifestações sistêmicas da doença periodontal, que incluíram produtos bacterianos, marcadores inflamatórios e dislipoproteinemia, que são fatores predisponentes a DCV (Ebersole et al, 1999), os resultados obtidos durante a arterectomia mostraram a presença de microorganismos patogênicos da periodontite nas lesões ateroscleróticas, como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* e *A. actinomycetemcomitans* (Chiu et al, 1999; Haraszthy et al, 2000). Estes microorganismos estão associados também à endocardite bacteriana e a coagulação sanguínea intravascular (Stelzel et al, 2002; Dorn et al, 1999). Em particular, *P. gingivalis* exibe severas condições que contribuem para a doença cardiovascular, ela induz a ativação e agregação plaquetária (Pham et al, 2002), aumento dos níveis de lipídios na circulação e a liberação de mediadores inflamatórios como IL-1, TNF- α e IL-6 (Hamada et al, 2002), que quando comparados com os níveis de indução da *E. coli*, apresenta níveis significativamente mais alto com *P. gingivalis* (Genco et al, 2002).

Doença periodontal e TGF- β . Papel dos Mastócitos

Sabe-se que a periodontite é uma infecção bacteriana que afeta a gengiva por acúmulo de placa bacteriana alterando a estrutura e suporte do dente. Este biofilme irá estimular uma resposta inflamatória ao hospedeiro provocando o dano tecidual. Conforme já descrito, na doença periodontal há presença de inúmeras células da resposta inata como, macrófagos, linfócitos e mastócitos, por exemplo.

Os mastócitos são células de defesa contra parasitas e infecções bacterianas intestinais e cutâneas, acredita-se que atualmente também são responsáveis pelo início da resposta imune adquirida (Mécherri & Dvid, 1997). Esta célula está normalmente localizada na vizinhança dos vasos sanguíneos, apresentando um papel importante no recrutamento de células da resposta imune, visto que durante a ativação imunológica, mastócitos liberam de seus grânulos mediadores pré-formados, incluindo citocinas, quimiocinas e enzimas, além de sintetizar novos mediadores (Kaminer et al., 1995).

Os mastócitos apresentam um papel crítico no desenvolvimento da inflamação da mucosa oral e da polpa dental tanto em eventos induzidos nos vasos como na transição da inflamação aguda para crônica, por sua proximidade aos vasos sanguíneos, funcionando como controlador da microvasculatura na cavidade oral. Por causa das múltiplas interações dos mastócitos com as células endoteliais, células nervosas e outros tipos celulares do sistema imune, o controle da ativação dos mastócitos pode servir como uma ferramenta terapêutica eficaz na inflamação.

Uma das células mais comuns no tecido periodontal é fibroblasto (Hassel, 1993). O papel desta célula é produzir as proteínas do tecido conjuntivo tais como, colágeno, fibronectina e elastina, como também as glicoproteínas e glicosaminoglicanos, que formam uma rede de emaranhado tecidual do tecido conjuntivo periodontal. Normalmente, os fibroblastos periodontais produzem e modificam a matriz extracelular e tem importante papel na manutenção da integridade e homeostasia tecidual (Hefti, 1993). Essas células secretam uma variedade de citocinas, quimiocinas imunoreguladoras, assim como, mediadores químicos que podem modelar positivamente ou negativamente a resposta inflamatória (Murakimi & Okada, 1998).

Uma das várias citocinas que sabemos que regula a inflamação e cicatrização sendo liberada pelos fibroblastos, participando, assim, da resposta imune é o fator transformador do crescimento (TGF- β). Este fator é um peptídeo que se expressa por quase todos os tipos de células e tem um importante papel no recrutamento de leucócitos, adesão e ativação da rolagem leucocitária em resposta a agressão bacteriana e ao desafio imunológico. (Souza et al., 2003;). O fato de TGF- β ser multi-funcional significa que este peptídeo apresenta importância fundamental em

uma variedade de processos fisiológicos normais e na patogênese de determinados processos de doença. Em análise observamos o envolvimento do TGF- β nos processos normais e patológicos dos tecidos oral-facial e dentes, entre outros. (Steinsvoll et al., 2004). TGF- β participa na cicatrização através da estimulação da proliferação do fibroblasto que está presente no tecido periodontal, aumentando a deposição de colágeno na matriz extracelular e a produção de inibidores da metaloproteinase do tecido (Gartner et al. 1992, Bennet et al. 1993). O reforço da expressão de TGF- β 1 em fibroblastos pode assim, ajudar a sustentar a homeostase do tecido e para contrabalançar a exagerada degradação do tecido conjuntivo periodontal. TGF- β 1 é o quimioatraente mais potente conhecido de mastócitos (Gruber et al. 1994). Dessa forma, investigar o papel regulatório do TGF- β na indução da doença periodontal em animais hipertensos pode funcionar como um estímulo de ataque para diminuição do processo.

Desse modo, o objetivo principal do presente estudo será investigar o papel dos mastócitos nos mecanismos envolvidos na expressão do Fator transformador do crescimento (TGF- β) pelo tecido gengival inflamado em ratos espontaneamente hipertensos.

3 PROPOSIÇÃO

Apenas alguns estudos avaliaram a associação entre a doença periodontal e doenças cardiovasculares (DCV). Uma visão geral mostrou que 15% destes estudos apresentam uma associação entre DCV e doença periodontal. De acordo com esses estudos, o estado crônico e intenso da inflamação local (periodontite), resulta na presença de mediadores da inflamação na circulação podendo assim iniciar ou exacerbar a doença cardiovascular. Vários componentes do sistema imune são ativados na doença periodontal, como a participação dos mastócitos da mucosa oral, que posicionados estrategicamente na vizinhança dos vasos sanguíneos, poderá influenciar a produção de fatores de crescimento assim como a resposta intracelular dos receptores de bactérias. Sabendo-se que essas células respondem a várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, essa interação poderá interferir notavelmente no controle do balanço entre a síntese de proteínas da matriz e sua degradação. Alterações nesse balanço podem induzir sérias lesões patológicas, principalmente diante de alguma doença sistêmica como a hipertensão. Dessa forma, o entendimento de como modular as atividades do reparo tecidual pode servir como uma terapêutica eficaz no controle da destruição periodontal que se manifesta exacerbada em pacientes evitando o início ou a agravamento das doenças cardiovasculares. Dessa forma, os objetivos do presente estudo serão:

- 1- Avaliar os níveis de reabsorção óssea nos ratos portadores de doença periodontal normais e espontaneamente hipertensos.
- 2- Avaliar a produção de mieloperoxidase na gengiva dos ratos normais ou SHR com doença periodontal;
- 3- Avaliar o papel dos mastócitos na expressão de TGF- β no tecido gengival de ratos normais e espontaneamente hipertensos com doença periodontal;
- 4- Avaliar a produção de CINC-2 pelo tecido gengival e plasma do sangue periférico de ratos normais e espontaneamente hipertensos com doença periodontal.
- 5- Investigar se a CINC-2 está envolvida nos mecanismos de indução da expressão de TGF-beta pelo tecido gengival em ratos normais e SHR com doença periodontal;

- 6- Avaliar o papel dos mastócitos na produção de colágeno tipo I na gengiva dos ratos espontaneamente hipertensos portadores de doença periodontal e do grupo controle

4 METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos de 180-200 g provenientes do biotério de ratos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- FOA-UNESP. Estes animais tiveram livre acesso à água e comida e estavam em uma sala climatizada com temperatura em torno de 20-22⁰C, com um sistema de exaustão e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Foram divididos em 8 grupos, sendo eles:

Grupo I	Ratos SHR (controle)
Grupo II	Ratos SHR com doença periodontal
Grupo III *	Ratos SHR depletados mastócitos com doença periodontal Composto 48/80 [0,6;0,6;0,6;1,2mg/kg]
Grupo IV *	Ratos SHR depletados mastócitos com doença periodontal Composto 48/80 [0,6;1,2;1,2;2,4mg/kg]
Grupo V	Ratos Wistar (controle)
Grupo VI	Ratos Wistar com doença periodontal
Grupo VII *	Ratos Wistar depletados mastócitos com Doença Periodontal Composto 48/80 [0,6;0,6;0,6;1,2 mg/kg]
Grupo VIII *	Ratos Wistar depletados mastócitos com doença periodontal Composto 48/80 [0,6;1,2;1,2;2,4 mg/kg]

* A realização de novos grupos de animais utilizando o tratamento com o composto 48/80 foi realizado devido ao fato de que os animais que receberam a dose de (0,6; 0,6; 0,6; 1,2 mg/kg) não tiveram seus mastócitos totalmente depletados no período

da realização da cirurgia para indução da doença periodontal. Dessa forma, realizamos um tratamento com uma nova dosagem (0,6; 1,2; 1,2 e 2,4 mg/kg).

Esses grupos foram subdivididos em 2 subgrupos para avaliação dos parâmetros inflamatórios em dois períodos de tempo:

Subgrupo A	Coleta após 7 dias de indução da doença periodontal.
Subgrupo B	Coleta após 14 dias de indução da doença periodontal

Avaliação da pressão arterial dos animais SHR

Os animais SHR foram avaliados quanto à pressão arterial pelo método indireto, utilizando o pletismógrafo e aferindo três dias seguidos, antes de cada experimento para avaliar se realmente estavam hipertensos.

Indução da doença periodontal nos animais normais e SHR.

A indução da doença periodontal foi realizada através de cirurgia. Um grupo de animais SHR foi submetido à indução da doença periodontal experimental e outro grupo (grupo sham) os animais sofreram a manipulação cirúrgica sem a indução da doença periodontal. Os animais foram anestesiados e a ligadura com fio de seda número 4 foi realizada em torno do primeiro molar de ambos os lados. Após um período de 7 e 14 dias respectivamente, os animais foram sacrificados para coleta das amostras para os ensaios subseqüentes.

Pré-tratamento dos animais com o composto 48/80.

Para avaliar o papel dos mastócitos no controle da doença periodontal, os ratos SHR e Wistar foram depletados, sistemicamente, de mastócitos pelo tratamento com composto 48/80, i.p., uma droga que induz degranulação dessas células. O composto 48/80 foi administrado em 2 diferentes dosagens: nos grupos III

e VII foi administrado, no 1º, 2º e 3º dia, duas aplicações de 0.6 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 1.2 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses); nos grupo IV e VIII foi administrado, no 1º dia duas aplicações de 0.6 mg/kg , 2º e 3º dia, duas aplicações de 1,2 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 2,4 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses). No 5º dia foi realizada a cirurgia para indução da doença periodontal nos animais em todos os grupos.

Com a finalidade de avaliar a eficiência das doses utilizadas na aplicação do composto 48/80 na desgranulação dos mastócitos, foi realizado um estudo, que consistiu na aplicação da droga em ratos Wistar, nas diferentes concentrações, em seguida realizado uma lavagem intraperitoneal com PBS+heparina1% e a quantidade de mastócitos foi avaliada no sobrenadante.

Coleta do sangue

As amostras foram coletadas dos animais pertencentes aos 8 grupos, no período da manhã, em horário igual para todos animais Os animais foram anestesiados e foi coletado 8 ml de sangue periférico pela canulação da aorta abdominal, através de seringas descartáveis de 10 ml heparinizadas (1ml). Os neutrófilos do sangue periférico coletado dos ratos foram purificados por meio de uma solução de Ficoll-Paque. O sangue foi colocado sob uma camada de 15 ml de Ficoll, e centrifugados a 1500 rpm por 20 minutos em 4°C. Após este período, o plasma foi retirado e armazenado em congelador com temperatura -20°C e a camada de mononucleares foi submetido à solução de lise pela presença de algumas hemácias, foi centrifugada à 1200 rpm por 5 minutos e armazenadas em TRIzol a uma temperatura de -70°C para realização de experimentos posteriores, e finalmente os polimorfonucleares ficaram junto com as hemácias no fundo do tubo. Os eritrócitos foram removidos por meio de lise hipotônica e centrifugados à 1200 rpm por 5 minutos. Normalmente, 95% dos polimorfonucleares são neutrófilos, estes foram armazenados em TRIzol a uma temperatura de -70°C.

Coleta do tecido gengival

As amostras do tecido gengival foram coletadas dos animais pertencentes aos 8 grupos, no período da manhã, em horário igual para todos animais. Foram retirados a gengiva marginal livre ao redor do 1º molar de ambos os lados do animal, com auxílio de instrumentos cirúrgicos. Depois, as amostras de cada animal foram devidamente armazenadas em congelador com temperatura de -70°C para dosagens posteriores.

Dissecação das mandíbulas

As mandíbulas foram coletadas dos animais pertencentes aos 8 grupos, e com auxílio de cabo e lâmina nº15 de bisturi, foram dissecados todos os tecidos moles, e foram armazenadas em fracos com álcool 70°.

Avaliação dos níveis de reabsorção óssea pelo programa Digora.

As mandíbulas dos animais foram dissecadas e armazenadas em álcool 70 até a realização das tomadas radiográficas, estas foram realizadas com o seguinte padrão: 40 cm de distancia da fonte de raio-x, 10mA, 60KVP, com 08 pulsos. Após as tomadas radiográficas, as imagens foram transferidas para o computador para analisamos utilizando o programa Digora. Neste programa medimos a região de distal dos molares que receberam a ligadura com os seus respectivos controles.

Avaliação dos níveis da enzima mieloperoxidase para a contagem de neutrófilos no tecido gengival

O tecido gengival dos animais SHR e Wistar foi coletado, triturado e armazenados a -20°C . Em uma placa de 96 poços pipetamos 40 μl da solução

NaPO₄ 0,08M em cada poço, em seguida pipetamos 100 µl da curva padrão (começando com 30.000 neutrófilos) e 10 µl da amostra. Em cada poço, tanto para curva como para as amostras, pipetamos 25 µl do TMB. Após cinco minutos adicionamos 100 µl de H₂O₂ e cinco minutos mais tarde 50 µL de H₂SO₄ a fim de parar a reação. Por fim realizamos a leitura no espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Avaliação dos níveis plasmáticos de NO₃.

O plasma periférico dos animais foi coletado para medir a produção NO. Em uma placa de 96 poços, pipetamos 40µL da curva padrão (começando com a concentração 200µM, para a curva NO₃), pipetamos também 40µL da amostra; e em cada poço para a curva ou para as amostras pipetamos 40µL do coquetel (500 µl NADPH ,1000 µl KH₂PO₄ tampão, 500 µl H₂O mais enzima (50 µl nitrate redutase mais 450 ul de H₂O), envolvemos a placa com papel alumínio e incubamos a 37°C overnight. No dia seguinte pipetamos 40µL da curva padrão do NO₂ (começando com a concentração de 200µM), acrescentamos 80µL do reagente de griess e em seguida realizamos a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

Determinação dos níveis de CINC-2 e TGF-β no plasma do sangue periférico e no tecido gengival de animais espontaneamente hipertensos submetidos à doença periodontal.

O plasma do sangue periférico e o tecido gengival dos animais SHR submetidos à doença periodontal experimental e do grupo sham foram coletados para dosagem de CINC-2 e TGF-β pelo método de ELISA.

ELISA: Placas de 96 poços serão recobertas e incubadas com anticorpos anti-CINC-2 ou TGF-β e diluídos em tampão de fosfato de cálcio, durante 15-18h a 4⁰C. Após o tempo de incubação, as placas serão lavadas com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e bloqueadores durante 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS

contendo 1% de BSA. As placas, então, foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes das células ou com recombinante específico durante 1 hora a 4^oC. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotilado anti-CINC-2 ou TGF- β por 30 minutos à 37^oC. As placas foram lavadas e o substrato adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490nm.

Extração e dosagem do RNA total dos neutrófilos e dos tecidos gengivais

O RNA total foi extraído a partir da maceração do tecido gengival e dos neutrófilos purificados do sangue periférico de todos animais dos grupos formados, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies).

Avaliação da expressão de mRNA para TGF- β , Colágeno tipo I, NOSi no tecido gengival de animais SHR com doença periodontal.

O tecido gengival dos animais SHR com doença periodontal e do grupo sham foram coletados para a avaliação da expressão de TGF- β , NOSi, Colágeno tipo I pelo método de RT-PCR.

RT-PCR: O RNA total foi extraído a partir da maceração do tecido gengival dos SHR com doença periodontal ou do grupo sham utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). A síntese do DNA complementar foi obtida em 20 μ l de uma mistura contendo 2 μ g RNA, 1 μ L dNTP 100mM, 5 μ l de um primer de oligo (dT)¹²⁻¹⁸ 0,5mg/ml, 5 μ l do inibidor para RNAase 40U/ml, 5 μ l transcriptase reversa 25U/ml e 10 μ l de dTT 0,1M. A mistura foi incubada durante 7 min. a 65^oC e depois por 1 h a 37^oC. A transcriptase reversa AMV foi desnaturada por 5 min. A 90^oC e em seguida, o cDNA obtido foi congelado para reação de polimerase em cadeia (PCR). A solução mix de PCR foi preparada em um volume final de 20 μ l contendo as seguintes substâncias: 0,5 μ l de cada dNTP 100 mM, 2 μ l de dTT 0,1M, 0,2 μ l de cada primer 300ng/ml e 1,5 μ L da enzima Taq polimerase 5U/ml. A mistura foi incubada em termociclador

seguindo-se as temperaturas que foram previamente padronizadas de acordo com o primer utilizado. As amostras de PCR correram em gel 2% de agarose que foi corado com 10mg/ml de brometo de etídio e o produto visualizado em luz ultravioleta e fotografado. Os primers das seguintes enzimas foram utilizados nos ensaios:

TGF- β : sense: TGC AGA GAT TCA AGT CAA CTG TGG
 antisense: AGC AGT AGT TGG TAT CCA GGG CTC

Colágeno tipo I: sense: GGT TAT GAC TTC AGC TTC CTG CCT
 antisense: ATG TAG GCT ACG CTG TTC TTG CAG

NOSi : sense: ATC CCG AAA CGC TAC ACT T
 antisense: TCT GGC GAA GAA CAA TCC

Avaliação da expressão de mRNA para TGF- β e NOSi em neutrófilos de animais SHR com doença periodontal.

Os neutrófilos purificados do sangue periférico dos animais SHR com doença periodontal e do grupo sham foram coletados para a avaliação da expressão de TGF- β pelo método de RT-PCR.

RT-PCR: O RNA total foi extraído a partir dos neutrófilos do sangue periférico dos SHR com doença periodontal ou do grupo sham utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies). A síntese do DNA complementar foi obtida em 20 μ l de uma mistura contendo 2 μ g RNA, 1 μ L dNTP 100mM, 5 μ l de um primer de oligo (dT)¹²⁻¹⁸ 0,5mg/ml, 5 μ l do inibidor para RNAase 40U/ml, 5 μ l transcriptase reversa 25U/ml e 10 μ l de dTT 0,1M. A mistura foi incubada durante 7 min. a 65°C e depois por 1 h a 37°C. A transcriptase reversa AMV foi desnaturada por 5 min. A 90°C e em seguida, o cDNA obtido foi congelado para reação de polimerase em cadeia (PCR). A solução mix de PCR foi preparada em um volume final de 20 μ l contendo as seguintes substâncias: 0,5 μ l de cada dNTP 100 mM, 2 μ l de dTT 0,1M, 0,2 μ l de cada primer 300ng/ml e

1,5µL da enzima Taq polimerase 5U/ml. A mistura foi incubada em termociclador seguindo-se as temperaturas que foram previamente padronizadas de acordo com o primer utilizado. As amostras de PCR correram em gel 2% de agarose que foi corado com 10mg/ml de brometo de etídio e o produto visualizado em luz ultravioleta e fotografado. Os primers das seguintes enzimas foram utilizados nos ensaios:

TGF-β : sense: TGC AGA GAT TCA AGT CAA CTG TGG

antisense: AGC AGT AGT TGG TAT CCA GGG CTC

NOSi : sense: ATC CCG AAA CGC TAC ACT T

antisense: TCT GGC GAA GAA CAA TCC

Análise estatística

ANOVA com correção de Bonferroni foi usado para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio.

5 RESULTADOS

Determinação dos níveis de pressão arterial em ratos SHR

Os animais hipertensos foram submetidos à pletismografia três dias seguidos, para a confirmação da pressão arterial alta (acima de 150 mmHg) (Tabela 1). Verificamos que todos os animais apresentaram os valores de pressão arterial acima de 150 confirmando a condição de hipertensos.

Tabela 1: Níveis de pressão arterial de 4 grupos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) avaliados durante três dias seguidos. Os valores expressos representam a medida de cada dia.

Ratos SHR		Pressão Arterial (mmHg) Dia 1	Pressão Arterial (mmHg) Dia 2	Pressão Arterial (mmHg) Dia 3	
Grupo I	SHR1	> 175	>175	≅175	
	SHR2	≅175	>150	>150	
	SHR3	≅190	≅200	≅190	
	SHR4	>150	≅175	>150	
	SHR5	>175	≅175	>175	
Grupo II	Subgrupo A	SHR1	≅200	≅200	>175
		SHR2	>175	≅175	≅175
		SHR3	200	200	≅200
		SHR4	>175	≅175	>175
		SHR5	≅190	>190	≅190
	Subgrupo	SHR1	>150	≅175	>150

	B	SHR2	>175	≈200	≈200
		SHR3	>150	>150	>150
		SHR4	≈175	≈175	>175
		SHR5	150	>150	150
Grupo III	Subgrupo A	SHR1	>175	≈200	≈200
		SHR2	≈200	≈200	>175
		SHR3	≈175	≈175	≈175
	Subgrupo B	SHR1	≈200	≈200	>175
		SHR2	>175	≈175	≈175
		SHR3	>175	≈200	≈200
Grupo VII	Subgrupo A	SHR1	≈175	≈175	> 175
		SHR2	≈175	>150	≈175
	Subgrupo B	SHR1	≈175	>175	>175
		SHR2	>150	>150	>150

Pré-tratamento dos animais com o composto 48/80.

Com a finalidade de avaliar a melhor dose do composto 48/80 capaz de induzir depleção sistêmica dos mastócitos de ratos foram utilizados dois tipos diferentes de concentrações do fármaco. Observamos no grupo de animais sem tratamento com o composto 48/80, a presença de grande quantidade de mastócitos com seus grânulos (Figura 1). Nos grupos de animais que foram tratados com o composto 48/80 utilizando a seguinte concentração: 1º, 2º e 3º dia, duas aplicações de 0.6 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 1.2 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses), houve a depleção dos mastócitos, mas essa não foi eficiente para depleção total dos mastócitos para o estudo de seu efeito 7 e 14 dias após a indução da doença periodontal (Figura 2 e 3). Dessa forma, resolvemos alterar a dose do

composto 48/80 para verificarmos um maior efeito da droga. Portanto, observamos uma maior eficácia na depleção de mastócitos, que durou cerca de 15 dias, no grupo de animais em que foi utilizada a seguinte concentração: no 1º dia duas aplicações de 0.6 mg/kg , no 2º e 3º dias, duas aplicações de 1,2 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 2,4 mg/kg (intervalo de 12hs entre as doses) (Figura 4 e 5). Dessa forma, para os experimentos subseqüentes utilizando tratamento com o composto 48/80 foi utilizada essa posologia.

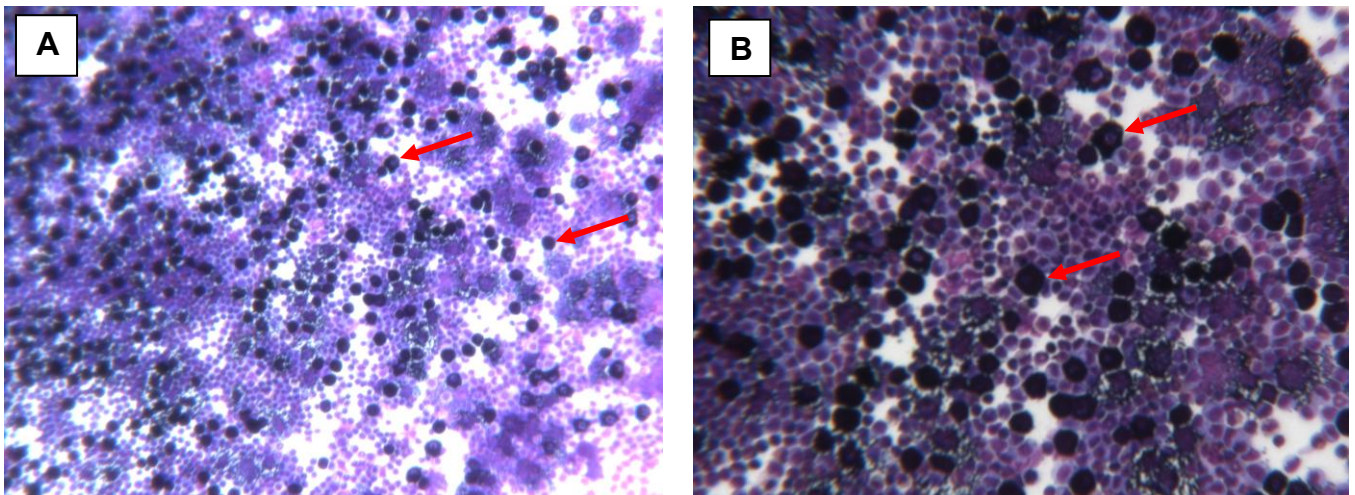


Figura 1. Lavagem peritoneal de ratos Controle (Sem aplicação do composto 48/80) (A) Lavagem peritoneal de rato, em aumento 20x, técnica utilizada: HE. **(B)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 40x, técnica utilizada: HE. Setas vermelhas marcam os Mastócitos.

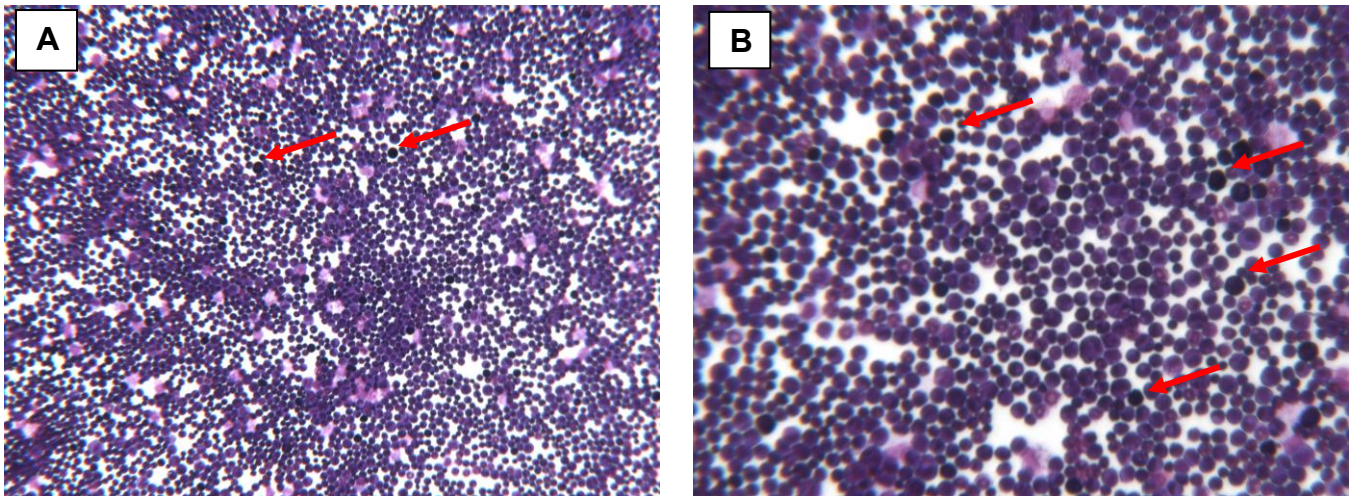


Figura 2. Lavagem peritoneal de ratos 7º dia após a aplicação do Composto 48/80, com a seguinte posologia: 1º, 2º e 3º dia duas aplicações de 0,6 mg/kg , e no 4º dia duas aplicações de 1,2 mg/kg (intervalo de 12hs entre as aplicações). **(A)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 20x, técnica utilizada: HE. **(B)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 40x, técnica utilizada: HE. Setas vermelhas marcam os Mastócitos.

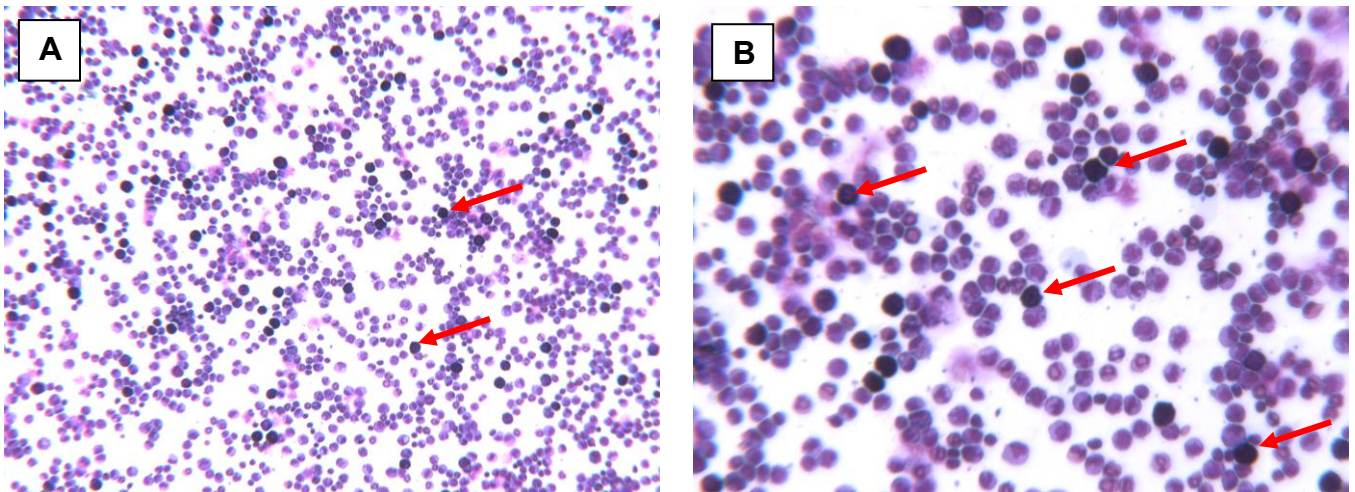


Figura 3. Lavagem peritoneal de ratos 14º dia após a aplicação do Composto 48/80, 1º, 2º e 3º dia duas aplicações de 0,6 mg/kg , e no 4º dia duas aplicações de 1,2 mg/kg (intervalo de 12hs entre as aplicações). **(A)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 20x, técnica utilizada: HE. **(B)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 40x, técnica utilizada: HE.

Setas vermelhas marcam os Mastócitos.

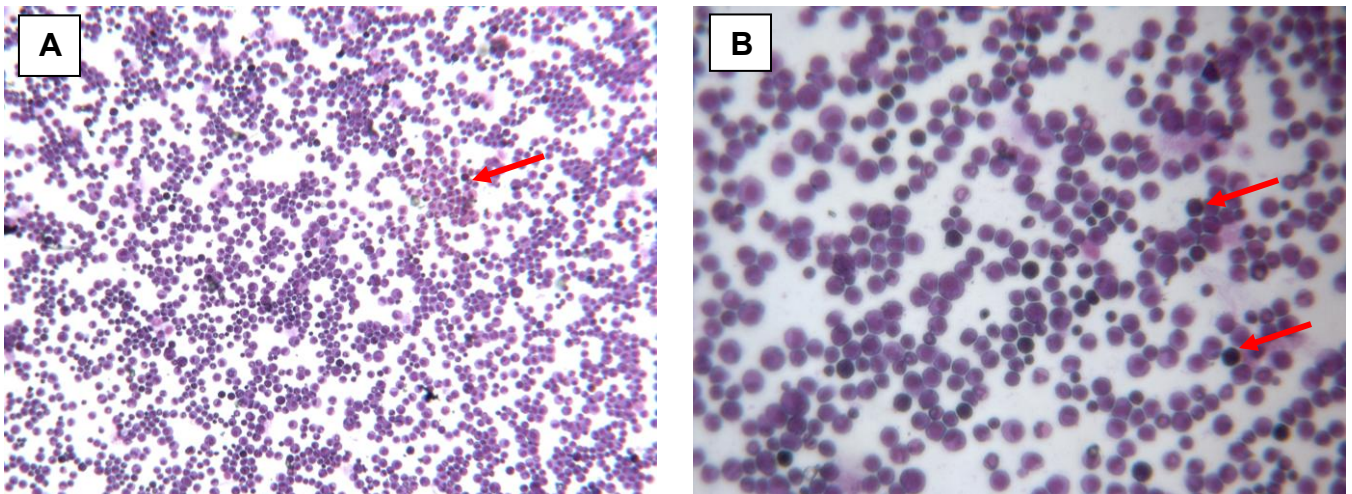


Figura 4. Lavagem peritoneal de ratos 7º dia após a aplicação do Composto 48/80, 1º dia duas aplicações de 0,6 mg/kg , 2º e 3º dia, duas aplicações de 1,2 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 2,4 mg/kg 1º (intervalo de 12hs entre as aplicações). **(A)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 20x, técnica utilizada: HE. **(B)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 40x, técnica utilizada: HE. Setas vermelhas marcam os Mastócitos.

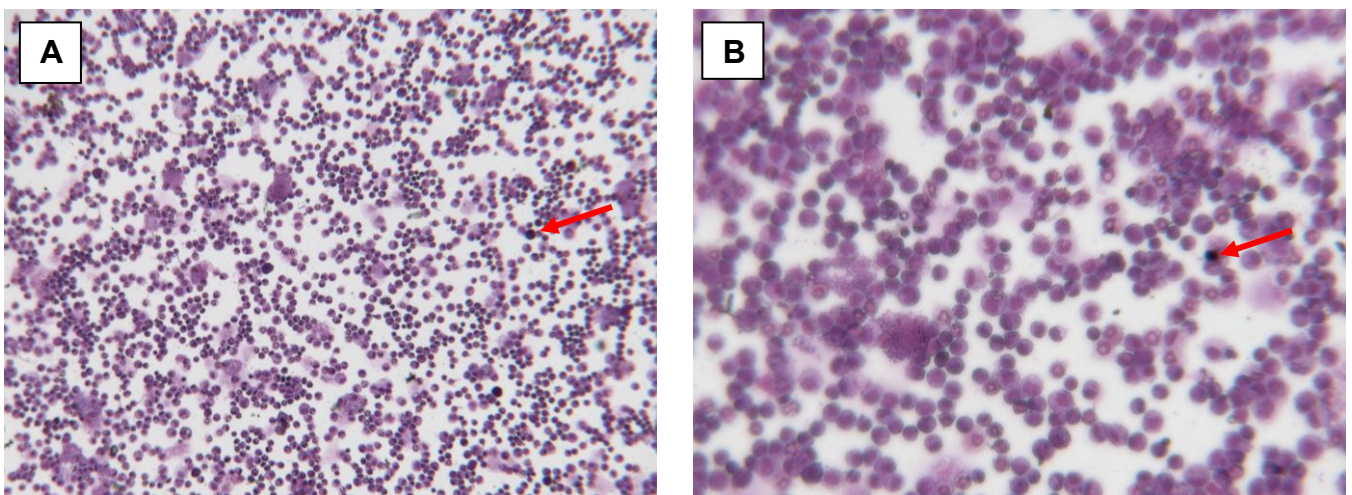


Figura 5. Lavagem peritoneal de ratos 14º dia após a aplicação do Composto 48/80, 1º dia duas aplicações de 0,6 mg/kg , 2º e 3º dia, duas aplicações de 1,2 mg/kg e no 4º dia duas aplicações de 2,4 mg/kg 1º (intervalo de 12hs entre as aplicações). **(A)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 20x, técnica utilizada: HE. **(B)** Lavagem peritoneal de rato, em aumento 40x, técnica utilizada: HE. Seta vermelha marca os Mastócitos.

Avaliação dos níveis de reabsorção óssea dos animais hipertensos e normotensos com e sem doença periodontal.

Com o objetivo de avaliar os níveis de reabsorção óssea após a indução da doença periodontal, realizamos o teste radiográfico das mandíbulas dos animais. Os dados representados na figura demonstram a densidade óssea, na região distal do 1° molar dos animais. No grupo de 7 dias podemos notar que houve uma reabsorção óssea nos animais Wistar e SHR após a indução da doença periodontal. Nos animais tratados com o composto 48/80 não houve alteração dessa reabsorção quando comparados com os animais Wistar e SHR com doença periodontal (Figura 6.A). No grupo de 14 dias podemos notar que houve reabsorção óssea nos animais Wistar e SHR após a indução da doença periodontal. Nos animais Wistar tratados com o composto 48/80 não houve alteração dessa reabsorção quando comparados com os animais Wistar com doença periodontal. Nos animais SHR tratados com o composto 48/80, houve uma diminuição da reabsorção óssea quando comparados com os animais SHR com doença periodontal e também quando comparados com os ratos Wistar que também foram tratados com o composto 48/80 (Figura 6.B).

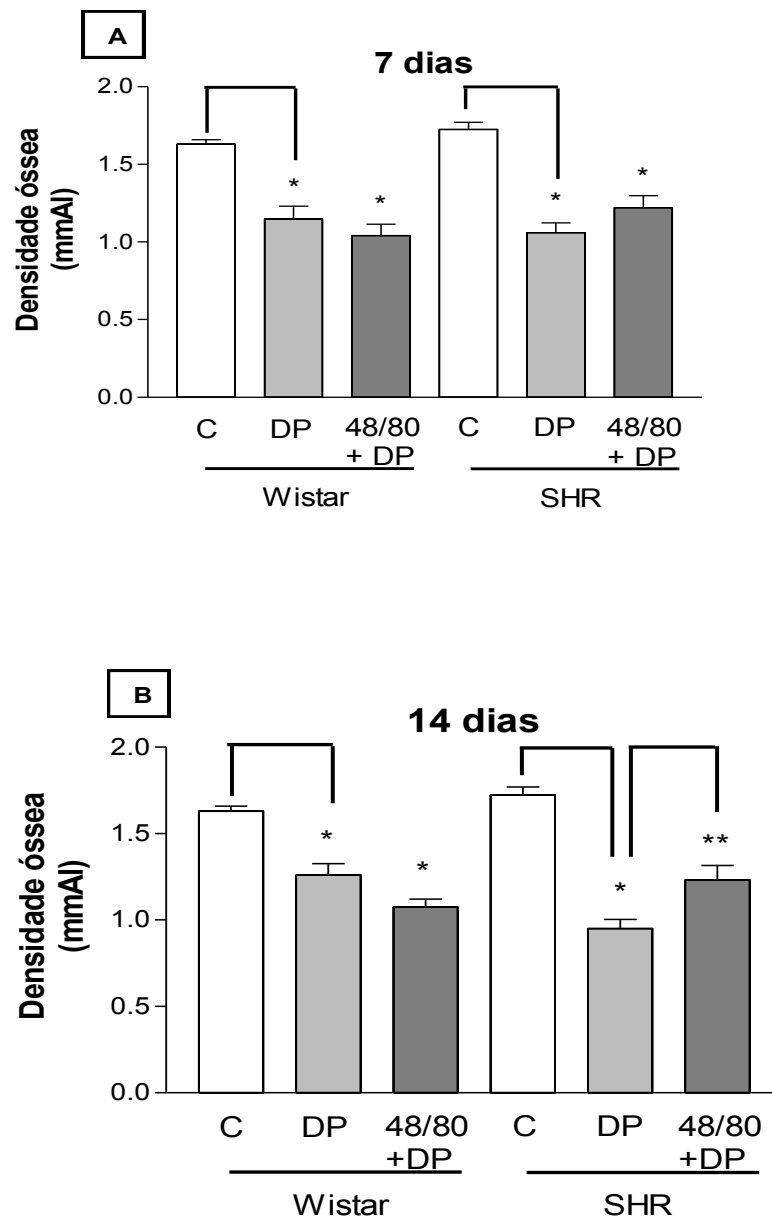


Figure 6 - Avaliação da densidade óssea de animais hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar) com e sem a doença periodontal (DP) e com e sem aplicação do composto 48/80 (48/84). A densidade óssea em mmAl foi avaliada na região distal do 1° molar de ambos os lados de animais hipertensos e normotensos com e sem a ligadura de indução da doença periodontal e com ou sem o pré tratamento com o composto 48/80 para depleção dos mastócitos **Painel A**: Após 7 dias de DP os animais foram sacrificados, as mandíbulas foram retiradas, dissecadas, radiografadas e analisadas, $p < 0,001$ (* vs C). **Painel B**: Após 14 dias de DP os animais foram sacrificados, as mandíbulas foram retiradas, dissecadas, radiografadas e analisadas, * $p < 0,001$ (Wistar C vs Wistar+DP, Wistar C vs Wistar+48/80, SHR C vs SHR+DP), # ($p < 0,001$ SHR C vs SHR+48/80, SHR+DP vs SHR+48/80) ($p < 0,01$ (Wistar+48/80 vs SHR+48/80), resultados são expressos por média \pm EPM em um grupo de 36 animais (ANOVA, com correção de Bonferroni)

Avaliação dos níveis da enzima mieloperoxidase.

Para avaliar o número de neutrófilos que migraram para o tecido gengival dos animais hipertensos e normotensos, dosamos os níveis da enzima mieloperoxidase. No grupo de 7 dias podemos notar que houve um aumento da migração de neutrófilos nos animais Wistar e SHR após a indução da doença periodontal. Nos animais Wistar tratados com o composto 48/80 não houve alteração no número de neutrófilos quando comparados com os animais Wistar com doença periodontal. Nos animais SHR tratados com o composto 48/80, houve uma diminuição da migração de neutrófilos quando comparados com os animais SHR com doença periodontal (Figura 7.A). No grupo de 14 dias podemos notar que houve um aumento da migração de neutrófilos nos animais Wistar e SHR após a doença periodontal. O tratamento com o composto 48/80 não alterou a migração de neutrófilos nos animais Wistar e SHR com doença periodontal (Figura 7.B).

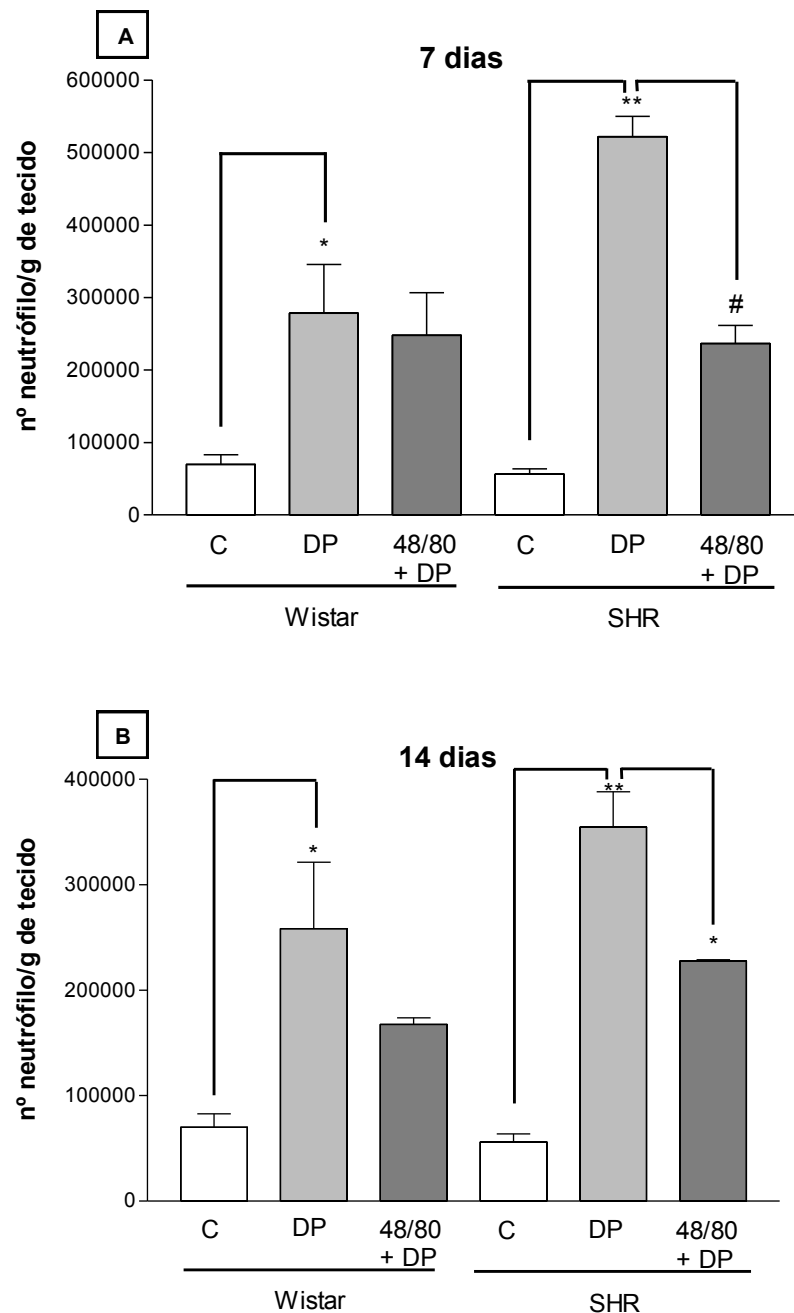


Figure 7 - Avaliação da enzima mieloperoxidase, marcadora de neutrófilos, em tecido gengival de animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR). Painel A: O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar foi coletado após 7 dias da indução da doença periodontal, triturado e analisado pela dosagem da enzima mieloperoxidase.* $P < 0.05$ (Wistar C vs Wistar+DP),** $P < 0.001$ (SHR C vs SHR+DP), # $P < 0.01$ (SHR+DP vs SHR+48/80). **Painel B:** O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar foi coletado após 14 dias da indução da doença periodontal, triturado e analisado pela dosagem da enzima mieloperoxidase. * $P < 0.05$ (Wistar C vs Wistar+DP e SHR C vs SHR+48/80), ** $P < 0.001$ (SHR C vs SHR+DP). Os resultados são expressos por média \pm EPM em um grupo de 36 animais. (ANOVA, com correção de Bonferroni)

Determinação dos níveis de óxido nítrico liberado no plasma sanguíneo periférico.

No sentido de avaliar os níveis de óxido nítrico liberado no plasma do sangue periférico dos animais hipertensos e normotensos com a doença periodontal e mastócitos e com doença periodontal e sem mastócitos, realizamos a dosagem de nitrato (NO_3).

Os resultados não foram satisfatórios, pelo fato das amostras analisadas estarem com concentração de NO_3 muito baixas, sendo assim, decidimos fazermos a determinação por RT-PCR através da expressão da enzima NOSi (Inibidor de Óxido Nítrico sintase) que será observado adiante.

Avaliação dos níveis de quimiocina CINC-2 α e citocina TGF- β no tecido gengival

1. CINC-2 α

Para realizar a dosagem da quimiocina CINC-2 α no plasma e no tecido gengival dos animais hipertensos e normotensos com e sem a DP, na presença e ausência dos mastócitos realizamos o ensaio imunoenzimático (ELISA).

A figura 8 apresenta os resultados dos níveis de CINC-2 α no tecido gengival nos grupos de 7 e 14 dias respectivamente. Observamos que os níveis de CINC-2 tende a aumentar nos animais Wistar e SHR na presença da doença periodontal. CINC-2 está aumentada na ausência dos mastócitos nos animais SHR com 7 dias após a indução da doença periodontal e tende a aumentar nos animais wistar sem mastócitos com 7 dias após a indução da doença periodontal (Figura 8.A). Nos animais com 14 dias de indução, os SHR com DP apresentaram aumento significativo em relação a seu controle (Figura 8.B). Para esta quimiocina, os valores plasmáticos não apresentaram níveis significativos.

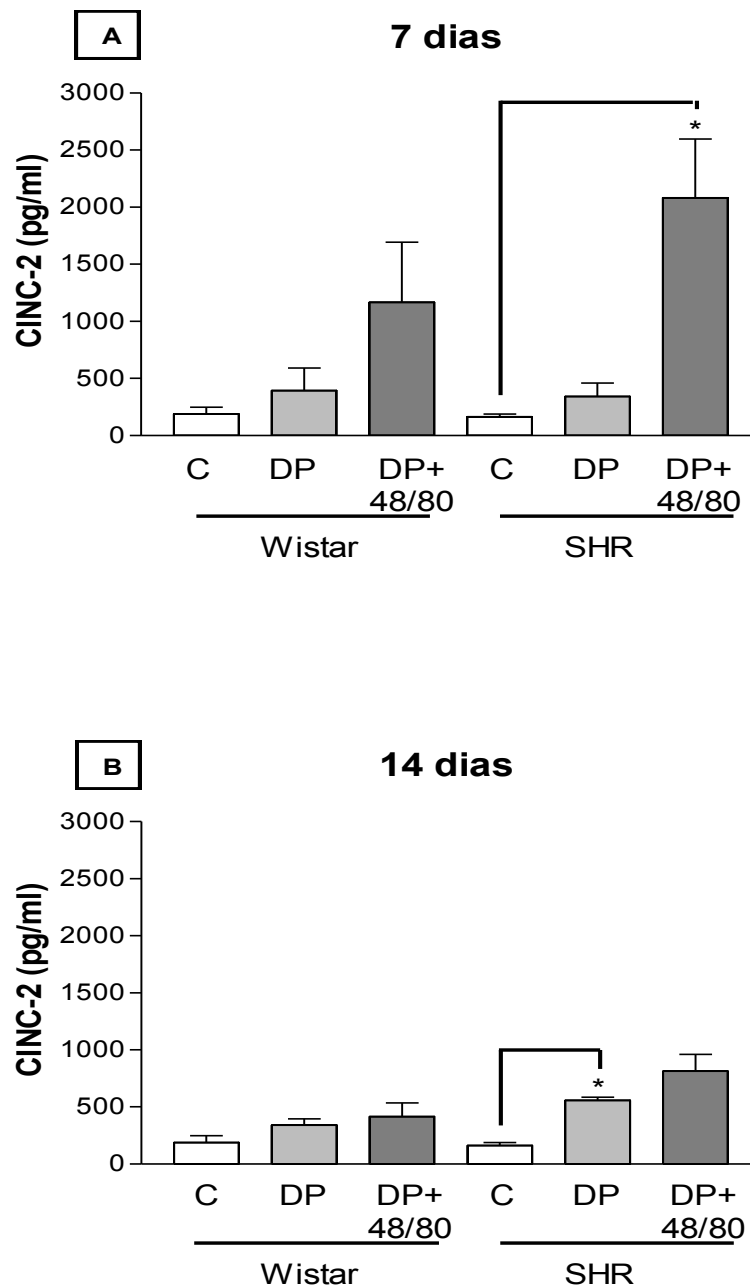


Figure 8 - Dosagem da quimiocina CINC-2 α no tecido gengival de ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR). **Painel A:** O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar, foi coletado após 7 dias da indução da doença periodontal, triturado e analisado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), (SHR C vs SHR+48/80 e SHR+DP vs SHR+48/80). **Painel B:** O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar, foi coletado após 14 dias da indução da doença periodontal, triturado e analisado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), (SHR C vs SHR+DP) Os resultados são expressos por média \pm EPM em um grupo de 60 animais., * P < 0.0001 (ANOVA, com correção de Bonferroni)

2. TGF- β

Para realizar a dosagem TGF- β no tecido gengival dos animais hipertensos e normotensos com e sem a DP, na presença e ausência dos mastócitos realizamos o ensaio imunoenzimático (ELISA).

A figura 9 apresenta os resultados dos níveis de TGF- β no tecido gengival nos grupos de 7 e 14 dias respectivamente. Observamos que os níveis de TGF- β não houve diferença nos animais Wistar e SHR na presença da doença periodontal e também na ausência dos mastócitos no período de 7 dias em relação ao seu controle(Figura 9.A). Nos animais com 14 dias de indução, TGF- β tende a aumentar na presença da doença periodontal tanto nos animais Wistar e SHR (Figura 9.B). Na ausência dos mastócitos nos animais Wistar com 14 dias após a indução da doença periodontal tem uma tendência de diminuir os níveis de TGF- β , no entanto nos animais SHR com 14 dias não houve alteração em relação a doença periodontal.

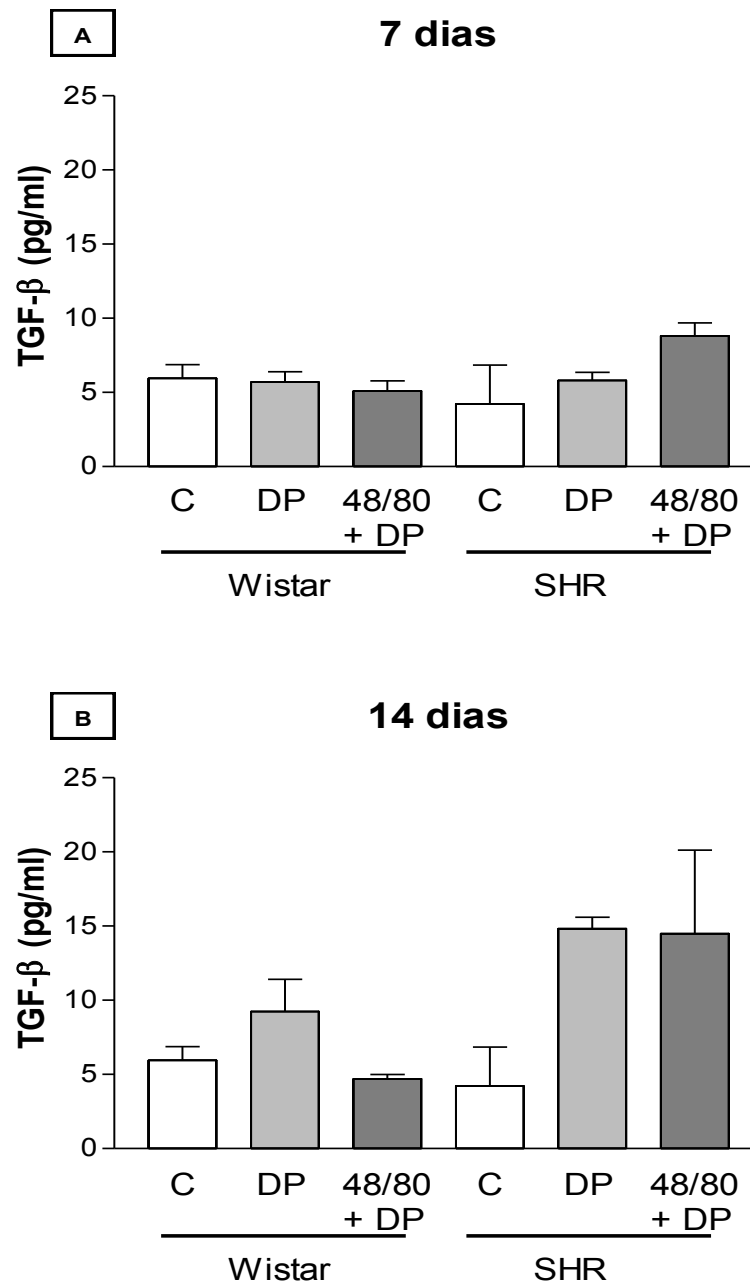


Figura 9 - Níveis da citocina TGF-β no tecido gengival de ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR). **Painel A:** O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar, foi coletado após 7 dias da indução da doença periodontal, triturado e analisado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). **Painel B:** O Tecido gengival dos animais SHR e Wistar, foi coletado após 14 dias da indução da doença. Os resultados são expressos por média \pm EPM em um grupo de 60 animais. (ANOVA, com correção de Bonferroni)

Extração e dosagem do RNA total dos tecidos gengivais

O RNA total foi extraído a partir da maceração do tecido gengival de todos animais para avaliação da expressão de TGF- β , colágeno tipo I e NOSi.

Avaliação da expressão de mRNA para TGF- β , Colágeno tipo I, NOSi no tecido gengival de animais SHR com doença periodontal.

Com o objetivo de avaliar a expressão de TGF- β , Colágeno tipo I, NOSi no tecido gengival, realizamos a indução da doença periodontal e após 7 e 14 dias foi coletado o tecido gengival e através do cDNA avaliamos a expressão. Observamos através da figura 10 que no tecido gengival dos animais de 7 dias de doença periodontal temos como resultado nos ratos Wistar a diminuição na expressão de TGF- β e NOSi nos animais com a doença periodontal e o aumento da expressão de Colágeno tipo 1, a ausência de mastócitos nesses animais acarretou um pequeno aumento na expressão de TGF - β e diminuição da expressão do Colágeno tipo 1 e do NOSi. Os animais SHR com 7 dias de doença periodontal teve aumento na expressão do TGF - β , colágeno tipo 1 e do NOSi, e na ausência de mastócitos ocorreu a diminuição da expressão.

Nos ratos Wistar com 14 dias de doença periodontal, houve diminuição da expressão de TGF- β e NOSi e aumento da expressão do colágeno tipo 1, a ausência de mastócitos diminuiu ligeiramente a expressão de TGF- β e aumentou o níveis de colágeno tipo1 e diminui NOSi. Os animais SHR com 14 dias de doença periodontal apresentou aumenta na expressão de TGF- β , colágeno tipo 1 e NOSi, a ausência de mastócitos faz com que os níveis de TGF- β e colágeno tipo 1 aumente ainda mais, e diminua a NOSi.

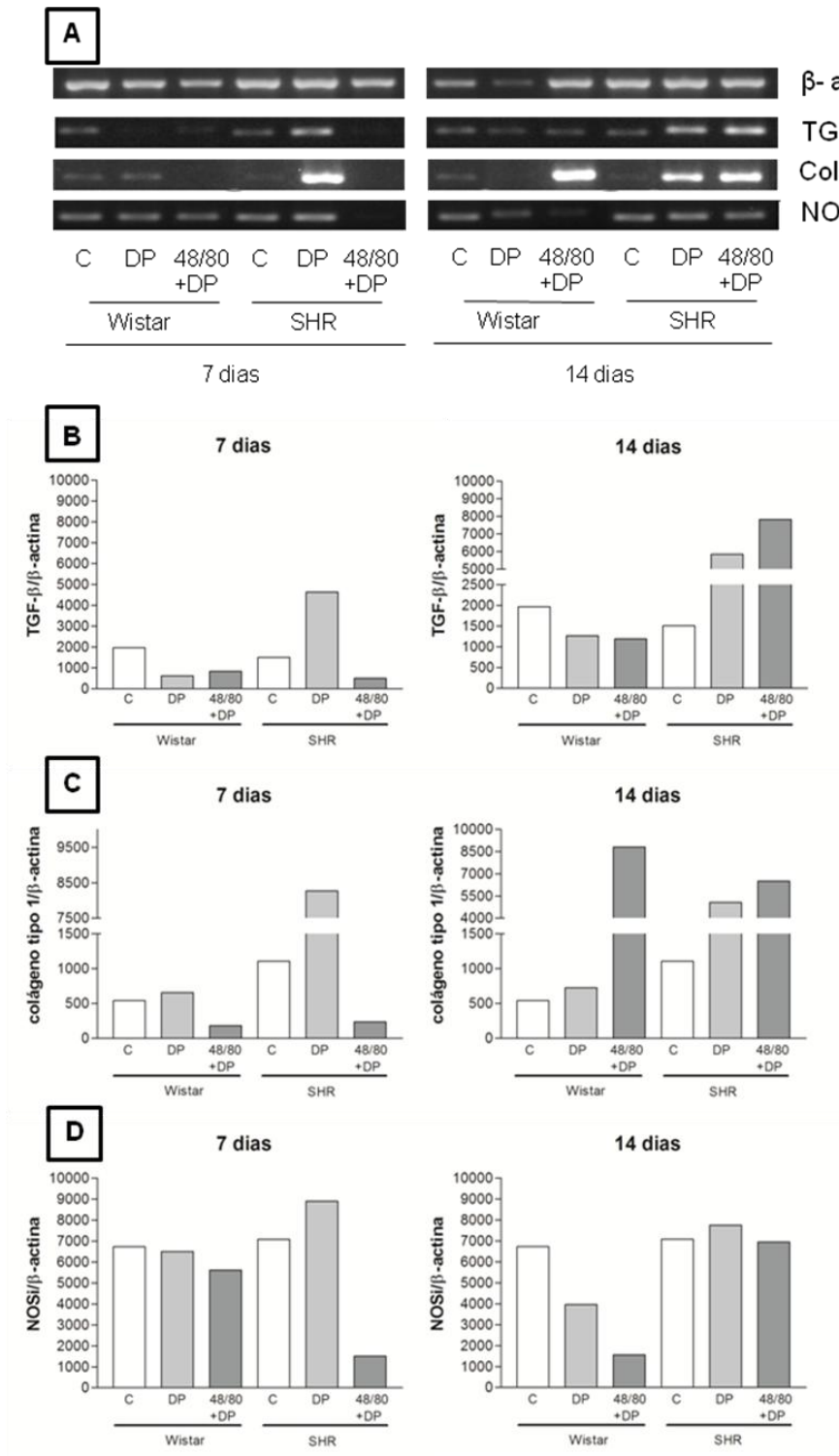


FIGURA 10: Avaliação da expressão de TGF- β , Colágeno tipo 1 e NOSi por RT-PCR em tecido gengival de ratos Wistar e SHR. Painel A: Expressão do TGF- β (387 bp), Colágeno tipo I (548 bp), NOSi (548 bp) e β -actina (445bp) como controle positivo em tecido gengival de ratos Wistar e SHR avaliados por RT-PCR no período de 7 e 14 dias de doença periodontal. A expressão de 2 μ g de RNA total foi avaliada usando gel de agarose 1,8%. Painel B,C e D: Representação da razão TGF- β / β -actina (B), Colágeno tipo I/ β -actina (C), NOSi/ β -actina (D) avaliado pela análise densitométrica.

Avaliação da expressão de mRNA para TGF- β e NOSi nos neutrófilos de animais SHR com doença periodontal.

Com o objetivo de avaliar a expressão de TGF- β , nos neutrófilos, realizamos a indução da doença periodontal e após 7 e 14 dias foi coletado o sangue periférico do animal e através de purificação do mesmo, conseguimos os neutrófilos, com seu cDNA e avaliamos a expressão. Observamos na figura 11 que a nível sistêmico nos animais de 7 dias de doença periodontal temos como resultado nos ratos Wistar a diminuição na expressão de TGF- β e com a ausência dos mastócitos o aumento da expressão. Nos SHR com 7 dias de doença periodontal também ocorre a diminuição na expressão de TGF- β e com a ausência dos mastócitos o aumento da expressão. Nos animais com 14 dias após a indução da doença periodontal avaliamos a diminuição da expressão de TGF- β nos ratos Wistar, e a ausência de mastócito acentua ainda mais essa diminuição. Nos SHR com 14 dias de doença periodontal a expressão de TGF- β aumenta e a ausência de mastócitos diminui a expressão. Não foi expresso por RT-PCR a enzima NOSi nos neutrófilos.

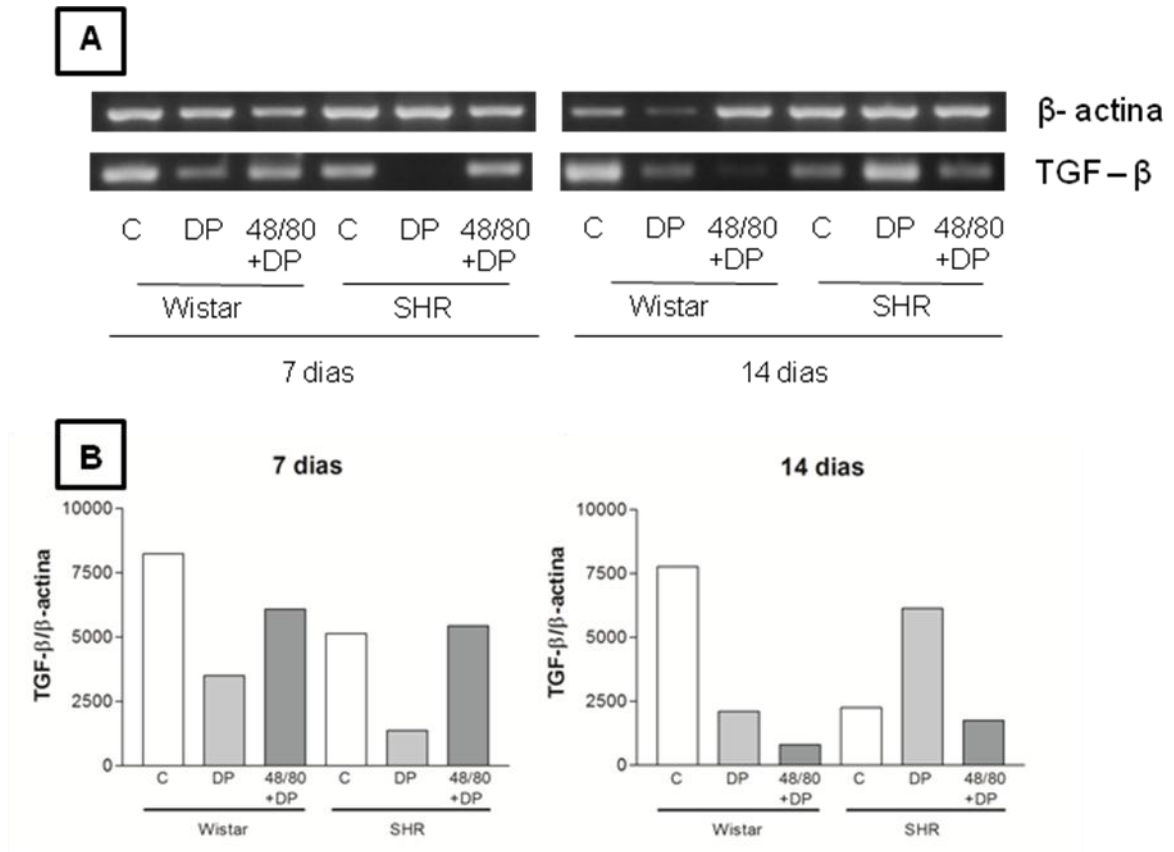


FIGURA 11: Expressão de TGF- β em neutrófilos de sangue periféricos de ratos Wistar e SHR. Painel A: Expressão do TGF- β (387 bp) e β -actina (445bp) como controle positivo em neutrófilos de sangue periféricos de ratos Wistar e SHR avaliados por RT-PCR no período de 7 e 14 dias de doença periodontal. A expressão de 2 μ g de RNA total foi avaliada usando gel de agarose 1,8%. Painel B: Representação da razão TGF- β / β -actina avaliado pela análise densitométrica.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A associação entre infecção dental e doença cardiovascular tem sido descrita, no entanto, os mecanismos envolvidos para que essa associação aconteça ainda não está completamente elucidado. O uso de animais espontaneamente hipertensos permite utilizar um modelo experimental de hipertensão para estudar as modificações funcionais junto a instalação da doença periodontal (Bell et al., 2004). Dessa forma, em nosso estudo demonstramos que os animais SHR apresentam uma facilidade maior em sofrer alterações imunológicas após desenvolver a doença periodontal e em alguns parâmetros, até mesmo antes da doença. Estudos experimentais demonstram que a ligadura que induz a periodontite resulta em degeneração do colágeno, e causa um aumento no número de neutrófilos e osteoclastos no processo alveolar (Bezerra, et al, 2000) o que resulta na reabsorção óssea. Em nossos resultados observamos que este fato acontece tanto em animais normotensos como em animais hipertensos, principalmente 14 dias após a doença periodontal, no entanto, em animais SHR houve uma diferença estatisticamente significativa no nível de reabsorção óssea quando comparados aos animais normotensos, demonstrando que a hipertensão aumenta a reabsorção óssea. Observamos que a ausência de mastócitos parcialmente diminuiu a reabsorção nos animais SHR, mas não em normotensos, possivelmente os mastócitos estejam produzindo algum mediador que seja responsável por acelerar o processo de destruição óssea, o que parecer ser mais evidente em animais SHR. Dados de literatura têm demonstrado que a histamina liberada pelo mastócitos após sua desgranulação nos estágios iniciais do processo inflamatório tem um papel importante na regulação da reabsorção (Fouilloux et al., 2006, Chiappetta & Gruber, 2006).

Os mastócitos estão normalmente localizados na vizinhança dos vasos sanguíneos, apresentando um papel importante no recrutamento de células da resposta imune (KAMINER et al., 1995). A ativação dessa célula possui um grande efeito biológico em uma variedade de células e tecido por ser capaz de liberar histamina, proteoglicanos, proteases, citocinas, especialmente TNF-alfa e IL-16. Além disso, é capaz de sintetizar mediadores derivados de lipídeos, citocinas, e quimiocinas que podem modular a resposta inflamatória (Mekori & Metcalfe, 2000).

Neutrófilos são polimorfonucleares (PMN) que têm um papel importante na resposta do hospedeiro contra microrganismos patógenos invasores. O papel dos PMN é bastante controverso na doença periodontal, uma vez que eles atuam na resposta do hospedeiro contra invasão bacteriana e ao mesmo tempo possuem o potencial de causar destruição tecidual (Kinane & Lappin, 2002; Van Dyke & Serhan, 2003). A presença de neutrófilos no local da lesão é observada através da dosagem da enzima mieloperoxidase, que é considerada um marcador de neutrófilos ativados que ficam armazenadas nessas células e lançada no fluido extracelular no estabelecimento de processo inflamatório (Montanher, 2000). Em nossos resultados observamos que ocorreu a migração de neutrófilos para o tecido inflamado tanto em animais normotensos como em animais hipertensos, embora possam observar, que nos animais SHR com doença periodontal o número de neutrófilos é maior quando comparados com os animais Wistar com doença periodontal. A constatação de que a mieloperoxidase está envolvida no estresse oxidativo e inflamatório tem sido um dos principais fatores para estudar esta enzima como um possível marcador de instabilidade da placa aterosclerótica e uma ferramenta útil na avaliação clínica de pacientes com doença coronária, pois a placa aterosclerótica apresenta um acúmulo focal de macrófagos, envolvendo resíduos de LDL e colesterol, no espaço subendotelial do vaso, caracterizando o estado inflamatório. O tratamento com o composto 48/80 dos animais SHR no período de 7 e 14 dias, mostrou a migração de neutrófilos para o tecido inflamado diminuída, portanto a ausência dos mastócitos, faz com que ocorra diminuição da migração dos neutrófilos para os tecidos com doença periodontal aguda, possivelmente pela ausência de mediador inflamatório liberado pelo mastócitos que apresenta quimiotaxia para neutrófilos.

A doenças cardiovasculares é um dos maiores problemas de saúde pública que representam um aumento da morbidade e mortalidade. Além da menopausa e idade avançada, outros fatores de risco para Doença cardiovascular como dislipidemia, estresse oxidativo, inflamação, hipertensão e diabetes também têm sido associados a um risco aumentado de baixa densidade mineral óssea (Mc Farlane et al, 2004).

A CINC-2 é uma quimiocina da classe CXC que está presente no tecido periodontal de ratos sugerindo que esta quimiocina estaria induzindo recrutamento de PMN em direção ao patógeno podendo ter um papel importante na iniciação da inflamação e subsequente destruição do tecido periodontal (Miyachi ET al 2004). Além disso, dados de literatura tem demonstrado que esta quimiocina tem outros efeitos em outras funções dos PMN, incluindo a expressão de moléculas de adesão, influxo de cálcio intracelular, e fagocitose (Nakagawa et al. 1994; Shibata et al. , 1995). Nossos resultados mostram que no local da inflamação apresenta níveis mais elevados de CINC-2 sendo esse aumento mais acentuado nos animais SHR do que nos animais normais, principalmente após 14 dias da instalação da doença periodontal. A ausência dos mastócitos aumentou ainda mais os níveis de CINC-2 principalmente nos animais SHR sugerindo que os mastócitos podem produzir alguma citocina e/ou quimiocina que esteja inibindo a produção de CINC-2. Dados de literatura mostram que mastócitos são capazes de produzir CINC-2 e possivelmente estejam modulando sua expressão (Kumar &Sharma, 2010).

A doença periodontal está associada à placa dentobacteriana, produtos bacterianos difundem-se através dos tecidos periodontais, induzindo mecanismos de defesa não específicos e específicos, com síntese de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo o óxido nítrico (NO). A enzima responsável pela produção de NO, a NO sintase (NOS), foi identificada em vários tipos celulares e possui ação direta sobre o metabolismo ósseo, bem como sobre fenômenos destrutivos teciduais e imunopatológicos. Com o objetivo de comparar a produção de NO sistemicamente, e o papel dos mastócitos nesse processo em animais hipertensos e normotensos com e sem a doença periodontal realizamos a dosagem dos níveis de nitrato no plasma pela técnica de Griess. Não obtivemos resultados significantes através da dosagem de NO₃, sendo assim, decidimos realizar a determinação por RT-PCR através da expressão da enzima NOSi (Óxido Nítrico sintase induzida) no local da lesão inflamatório, avaliando a expressão dessa enzima no tecido gengival. A expressão da enzima NOSi é uma resposta a um estímulo inflamatório e produz uma grande quantidade de óxido nítrico (NO), o qual pode atuar como uma molécula citotóxica contra o microorganismo invasor e pode estar relacionada a ambos efeitos prejudiciais e benéficos para os tecidos (Batista ET AL, 2002). Em nossos dados demonstram que tanto nos grupos de 7 e 14 dias de doença periodontal, houve uma

ligeira diminuição da expressão da enzima NOSi no tecido gengival de ratos Wistar com doença periodontal e uma diminuição ainda maior na ausência dos mastócitos, já nos animais SHR, houve um ligeiro aumento na expressão de NOSi na presença da doença periodontal e na ausência dos mastócitos houve uma redução da expressão da enzima, principalmente 7 dias após a indução da doença. Os resultados indicam que a expressão da enzima NOSi já apresenta-se elevada em animais Wistar e SHR sem a doença, e que a doença reduziu a expressão no animal normotenso e aumentou ligeiramente em animais SHR. Esses resultados favorecem a idéia de que a expressão da enzima NOSi está sendo modulada, possivelmente por uma mistura de citocinas pró-inflamatórias. Em células epiteliais alveolares a expressão de NOSi foi modulada por uma mistura de IL-1beta, TNF-alfa e IFN-gama (Nishina et al., 2005).

TGF- β é uma citocina que pode ser classificado como pró-inflamatórias porque é quimiotático para neutrófilos, monócitos, mastócitos e linfócitos, mas também tem potente papel imunossupressor, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias ([IL] interleucina-1, IL-12, fator de necrose tumoral- α (TNF- α)(Chantry et al. 1989, Musso ET al. 1990) O TGF- β é quimiotático para fibroblastos portanto é um estimulador potente de síntese de colágeno. De acordo com Varo et al, 2000, os animais hipertensos apresentam exagerada síntese de colágeno e inadequada degradação do colágeno no ventrículo esquerdo do coração, além disso, observaram aumento da expressão e da atividade de TGF- β em SHR. Em nossos resultados observamos que no tecido gengival a expressão de TGF- β aumenta principalmente em animais SHR 7 e 14 dias após a indução da doença, sendo mais expressivo no período de 14 dias, e a ausência do mastócitos diminuir a expressão de TGF- β em SHR 7 dias após a indução da doença e não alterou 14 dias após. Quando comparamos a expressão de colágeno tipo I pelo tecido gengival observamos que o aumento da expressão de TGF- β favorece ao aumento da expressão da síntese de colágeno, possivelmente pela estimulação dos fibroblastos gengivais por TGF- β . Dessa forma, em conjuntos esses dados favorecem ao aumento do tecido cardíaco e a progressão da hipertensão.

Segundo citou Varo et al, 2000, nos animais SHR a expressão de colágeno tipo I é maior, podendo ser considerado um fator prejudicial a hipertensão. A

ausência dos mastócitos no período de 14 dias de doença periodontal, potencializou a expressão do colágeno tipo I tanto nos Wistar quanto nos SHR, sendo assim, podemos sugerir que o mastócitos através dos seus mediadores auxilia na regulação da expressão do colágeno, pela liberação de mediadores inflamatórios que podem manipular o controle da síntese, ou da degradação do colágeno, possivelmente pela produção de TGF- β .

Tomados em conjunto, nossos estudos mostram que o pico da resposta inflamatória foi 7 dias após a doença periodontal e a reabsorção óssea ocorreu 14 dias após, sendo maior em animais SHR. O mastócito apresenta uma resposta dual sobre os parâmetros analisados, sendo que todas as respostas estão potenciadas em animais SHR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE GC. Periodontal infections and cardiovascular disease-how strong is the association? *Oral Disease*; 6: 335–350, 2000.

BAELUM V, CHEN X, MANJI F, LUAN W-M, FEJERSKOV O. Profiles of destructive periodontal disease in different populations. *J Periodont Res* 1996;

BEZERRA MM, LIMAV, ALENCAR VBM, VIEIRA IB, BRITO GAC, RIBEIRO RA, ROCHA FAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000; 71:1009-1014 31:17-26.

BRUNETTI, M. C.. *Periodontia Médica. Uma abordagem integrada*. São Paulo: Editora Senac São Paulo. 2004. 633p.

BATISTA A.C, SILVA TA, CHUN JH, LARA V.S. Síntese de óxido nítrico e a severidade da doença periodontal humana. *Oral Disease* Volume 8, N^o 5, páginas 254-260, Setembro de 2002

BECK JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbecher S: Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J* 138:S528-33, 1999

BELL D, KELSO EJ, LEE GR, ALLEN AR, MCDERMOTT BJ. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol* 2004, 13:71-78.

BENNETT, N. T. & SCHULTZ, G. S. (1993) Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *American Journal of Surgery* 166, 74–81.

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*. 46: 576–582, 1978

CHANTRY, D., TURNER, M., ABNEY, E. & FELDMANN, M. (1989) Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β . *Journal of Immunology* 142, 4295–4300.

CHIAPPETTA N, DO,* AND BARRY GRUBER, MD,† .The Role of Mast Cells in Osteoporosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Volume 36, Issue 1 , Páginas 32-36, Agosto. 2006

CHIU B: Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 138:S534-6, 1999

DESTEFANO F, ANDA RF, KAHN HS, WILLIAMSON DF, RUSSELL CM: Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *Clinical research* 13:688-91,1993.

DRISCOLL KE, HASSENBEIN DG, HOWARD BW, ISFORT RJ, CODY D, TINDAL MH, SUCCHAN EK M, CARTER JM . Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J Leukoc Biol* 58:359–364 (1995)

DORN BR,DUNN WA Jr, PROGULSKE-FOX A: Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun* 67: 5792-8, 1999

EBERSOLE JL, CAPPELLI D, MOTT G ET AL: Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate. *J Periodontal Res* 34:358-62, 1999

FLEMMIG TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):32-38, 1999.

FOUILLOUX MBD, BAROUKH B, CHERRUAU M, SAFFAR JL, LESCLIOUS P. Mast cell activation and degranulation occur early during induction of periosteal bone resorption. *Bone* 38:59-66, 2006.

GARCIA RI, HENSHAW MM, KRALL EA. Relationship between periodontal disease and systemic Health. *Periodontology* 200 25: 21-26, 2001.

GARTNER, M.H; BENSON, J.D; CALDWELL, M.D. insulin like growth factors I and II expression in the healing wound. *J. Surg. Res.*, v. 52, p.389-394, 1992

GENCO RJ, LOE H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2:98-116, 1993

GENCO R, OFFENBACHER S., BECK J., Periodontal disease and cardiovascular disease *J Am Dent Assoc*, Vol 133, No suppl_1, 14S-22S. 2002

GRUBER, BL., MARCHESE, M.J. & KEW, R.R. " Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. " *J Immunol*, 152, 5860-7. 1994

HAMADA N, WATANABE K, ARAI M ET AL: Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from porphyromonas gingivalis. *Oral microbial Immunol* 17: 197-200, 2002

HARASZTHY VI, ZAMBON JJ, TREVISAN M ET AL: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J periodontal* 71:1554-60, 2000

HASSEL TM. Tissue and cells of the periodontium. *Periodontology* 2000 3:9-38, 1993.

HEFTI AF. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology* 2000 3:64-75, 1993.

JANDINSKI JJ; STASHENKO P; FEDER LS; LEUNG CC; PEROS WJ; RYNAR JE; DEASY Localization of interleukin-1b in human periodontal tissue. *J. Periodontol.*, Chicago, v.62, p.36-43, 1991.

JIN LJ, CHIU GK, CORBET EF. Are periodontal diseases risk factors for certain systemic disorders--what matters to medical practitioners? *Hong Kong Med J* 9(1):31-7, 2003.

JOHNSON-LEONG C, PATEL G, MESSIEHA Z. The relationship between coronary artery disease and periodontal disease. *Dent Today* 22(2):100-5, 2003.

KAMIER MS, MURPH GF, ZWEIMAN B, LAVKER RM. Connective tissue mast cell exhibit-time dependent degranulation heterogeneity. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2:297-301, 1995

KINANE DF, LAPPIN DF. Immune Process in periodontal Disease: A Review. *Ann Periodontol* 7(1): 62-71,2002.

KUMAR V., SHARMA A. Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. Review. *Molecular Immunology* 48 (2010) 14–25

MAYRAND D, HOLT SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev.* 1988 Mar;52(1):134-52.

MEKORI YA, METCLAFE DD. Mast cells in innate immunity. *Immunological review* 173:131-140, 2000.

MÉCHERI S, DAVID B. Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity? *Immunol Today* 18:212–215. 1997

MIYAUCHI M, KITAGAWA S, HIRAOKA M, SAITO A, SATO S, KUDO Y, OGAWA I, TAKATA T. Immunolocalization of CXC chemokine and recruitment of polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol.* 2004

MYERS CD. Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response. *FASEB J* 5: 2547, 1991

MURAKAMI S, OKADA H,. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*;9:248-66. 17,1998

MUSSO, T., ESPINOZA-DELGADO, I., PULKKI K., GUSELLA, G. L., LONGO, D. L. & VARESIO, L. Transforming growth factor b down regulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood* 76, 2466–2469. (1990)

NAKAGAWA H, KOMORITA N, SHIBATA F, IKESUE A, KONISHI K, FUJIOKA M, ET AL. Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2a and CINC-2b, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. *Biochem J* 1994; 301:545–50.

NISENGARD RJ. The role of immunology in periodontal disease. *J. Periodontol* 48:505,1997

NISHINA K, ZHANG F, NIELSEN LD, EDEEN K, WANG J, MASON RJ. Expression of CINC-2beta is related to the state of differentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Nov;33(5):505-12.2005

OPPENHEIM, J. J., ZACHARIAE, C. O. C., MUKAIDA, N. AND MATSUSHIMA, K.. Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 617-648. (1991).

PHAM K, FEIK D, HAMMOND BF ET AL: aggregation of human platelets by gingipain-R from porphyromonas gingivalis cells and membrane vesicles. *Platelets*, 13: 21-30, 2002.

SHIBATA F, KATO H, KONISHI K, OKUMURA A, OCHIAI H, NAKAJIMA K, ET AL. Differential changes in the concentrations of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and CINC-2 in exudate during rat lipopolysaccharide-induced inflammation. *Cytokine* 1996; 8: 222–6.

SHIBATA F, KONISHI K, KATO H, KOMORITA N, AL-MOKDAD M, FUJIOKA M, ET AL. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC- 2a, CINC-2b and CINC-3. *Eur J Biochem* 1995; 231: 306–11.

SOUZA AP, TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINANGA RM, DE BRITO RB, LINE SR. Analysis of the TGF- β -1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodont* 30:519-523, 2003.

STEINSVOLL S, HELGELAND K, SCHENCK K. Mast cells – a role in periodontal diseases?. *J Clin Periodontol* 2004,

STELZEL M, CONRADS G, PANKUWEIT S ET AL: detection of porphiromonas gingivalis DNA in aortic by PCR. J periodontal 73: 868-70, 2002

VAN DYKE TE. SERHAN CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. J Dent Res 82(2):82-90, 2003

VARO N, MARI'A J. IRABURU, MARTA VARELA, BEGON' A LO' PEZ, JUAN C. ETAYO, JAVIER DI'EZ. Chronic AT1 Blockade Stimulates Extracellular CollagenType I Degradation and Reverses Myocardial Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats Hypertension 2000;

WAHE SM, GENCO RJ; MERGENHAGEN SE Mononuclear cell-mediated alterations in connective tissue. In, eds Host Parasite Interactions in Periodontal Defective Disease. Washington DC. American Society for Microbiology,p.132.,1982

WALSH L.J Mast cells and oral inflamation. Crit Rev Oral Biol Med 14(3):188-198 (2003)

WILSON M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. Sci Prog. 78 (Pt 1):19-34, 1995.

WIRTHLIN MR, HUSSAIN MZ. Clinical and light microscopic observation of gingivitis and early ligature-induced periodontitis in the cynomolgus monkey. J Periodontol 63:533-539. 1992.

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba




COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"EFEITO DA HIPERTENSÃO SOBRE A ATIVIDADE FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS, REABSORÇÃO ÓSSEA E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA POR RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS A DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL"** sob responsabilidade de SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA E CAROLINA FERREIRA BONATO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 15 de fevereiro de 2006, de acordo com o protocolo nº 52/06

Araçatuba, 15 de fevereiro de 2006


Prof.^a Ass. Dr.^a Maria Gisela Laranjeira
Presidente