



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO**



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

PABLO DALLARI RAMALHO LUCAS

Inibição do Receptor tipo-1 Ativado por Protease (PAR₁) na
Doença e Reparo Periodontal

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

PABLO DALLARI RAMALHO LUCAS

Inibição do Receptor Tipo-1 Ativado por Protease (PAR₁) na
Doença e Reparo Periodontal

ação em
ade de
Estadual
logia.

ARARAQUARA

2012

Lucas, Pablo Dallari Ramalho

Inibição do receptor tipo-1 ativado por protease (PAR₁) na doença e reparo periodontal / Pablo Dallari Ramalho Lucas.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

80 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

1. Inflamação 2. Receptor PAR-1 3. Moduladores de angiogênese
I. Título

Pablo Dallari Ramalho Lucas

**Inibição do Receptor Tipo-1 Ativado por Protease (PAR₁) na
Doença e Reparo Periodontal.**

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em Odontologia

Presidente da Banca e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

2º Examinador: Prof. Dr. Rogério Margonar

3º Examinador: Prof. Dr José Eduardo Cezar Sampaio

Araraquara, 20 de Março de 2012

DADOS CURRICULARES

Pablo Dallari Ramalho Lucas

- NASCIMENTO** 24 de Abril de 1985 – João Pessoa/PB
- FILIAÇÃO:** Dale Alencar Lucas de Lacerda
Magna Sueli Ramalho Lucas
- 2004-2008 Curso de Graduação em Odontologia pela
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
- 2009-2011 Curso de Especialização em Implantodontia pela
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em
Odontologia - FAEPO
- 2010-2012 Curso de Pós Graduação em Odontologia, Área de
Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de
Odontologia de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

À minha mãe

Magna Sueli Ramalho Lucas, por seu amor incondicional, exemplo de mulher, apoio e eterno incentivo em todas as minhas escolhas.

Ao meu pai

Dale Alencar Lucas de Lacerda, pelo seu amor, exemplo profissional e de caráter, amizade sincera, apoio em minhas escolhas e por tudo o que me ensinou.

Aos meus irmãos

Priscilla Ramalho Lucas e Patrick Ramalho Lucas, por estarem sempre ao meu lado, pelo incentivo e por serem além de irmãos, grandes amigos.

Amo vocês

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, por sua proteção, pelas oportunidades a mim proporcionadas, por sempre iluminar meu caminho.

A minha **Família** pelo apoio em tudo o que faço, pelo incentivo e pela presença em todas as minhas conquistas.

Ao meu orientador **Luis Carlos Spolidorio** pelo ensinamento, paciência e compreensão durante estes dois anos.

Aos meus amigos **João Paulo Steffens** e **Rafael Scaf de Molon** pela ajuda sem a qual jamais concretizaria este trabalho, por sua amizade dentro e fora da faculdade e por saber que sempre poderei contar com vocês e por fazer dos meus dias aqui mais divertidos e prazerosos durante estes dois anos.

Aos amigos do mestrado **Luis Guilherme** (Luizinho), **Fausto**, **Marcell**, **Felipe** (Réio), **Fabiana** (Fabi), **Giovana** (Gi), **Fernanda** (Fer), **Sabrina** (Galega) e **Lívia** (Livinha) por tudo o que fizeram por mim nestes dois anos, pelo apoio durante a realização deste trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar quando precisei.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação **Mário Verzola, Guilherme Oliveira (Gui), Jônatas Esteves, Rubens Moreno (Rubinho), Lucas Fontanari (Lucão), João Antônio de Souza, Felipe Coletti, Túlio Durigan Basso, Rubens Spin Neto (Rubão), Ricardo Andrés, Wagner Nunes de Paula, Nicolau Conte Neto, Leila Coimbra, Lívia Perussi, Shelon Souza, Marina Bellucci, Luana Pires, Morgana Guimarães, Alliny Bastos, Cássia Corrêa, Andressa Nogueira, Chaine Pavone e Nicole Nogueira** pelo incentivo, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos **Ronan Braga Araújo, Elton Carlos Pichotano, Eider José Mesquita Júnior, Lincoln Padovani Garofo, Mário Lúcio da Costa Azevedo, Gabriel Scarpini, Matheus Coelho Bandeca, Bruno Herrera, Pedro de Souza (Pedrão), Danny Omar Mendoza Marin, Kaline da Silva Ramos e Érika Dorigatti de Ávila** pelo apoio, incentivo e companheirismo durante este tempo.

Aos Professores da **Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp: Cleverton Roberto de Andrade, Denise Madalena Palomari Spolidorio, Carlos Alberto Souza Costa, Carlos Benatti Neto** pelo apoio, compreensão e ajuda.

Aos Funcionários do **Departamento de Fisiologia e Patologia**, em especial ao **José Roberto (Zé)** e à **Juliana Pirola (Ju)**.

Aos Professores da **Disciplina de Periodontia** da **Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp**: **José Eduardo, Joni, Adriana, Elcio, Silvana e Carlos** pelo conhecimento que me passaram.

Aos funcionários do **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, em especial à **Regina Lúcia, D. Maria, Cláudia, Maria José e Leandro** pela atenção a mim dispensada.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp**, pela oportunidade de crescimento profissional.

À **CAPES** pelo apoio financeiro por meio de Bolsa de Estudos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DA LITERATURA.....	22
PROPOSIÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODO.....	38
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	78

RESUMO

Ramalho-Lucas PD. Inibição do receptor tipo-1 ativado por protease (PAR₁) na doença e reparo periodontal. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/ UNESP; 2012.

RESUMO

A sinalização celular por PAR₁ tem mostrado influenciar uma ampla gama de respostas patofisiológicas, incluindo ativação plaquetária, crescimento tumoral, inflamação e metástases. Baseando-se nisto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do Parstatin, droga que tem ação biológica oposta àquela desencadeada pela ativação do PAR₁, durante o processo de indução e reparo da inflamação. Foi utilizado um modelo de periodontite experimental em ratos através da instalação de ligaduras de fio de algodão nos segundos molares superiores. Para isto, 72 ratos foram separados aleatoriamente em 9 grupos com 8 animais cada e receberam as ligaduras e injeção de veículo ou Parstatin nos períodos de 7 e 14 dias para observar a ação da inibição deste receptor nos períodos de indução de inflamação e reparo. Após estes períodos, os animais foram sacrificados e tiveram as maxilas removidas, dissecadas e divididas ao meio para avaliação histológica e radiográfica a fim de caracterizar infiltrado de células inflamatórias e perda óssea ao redor dos dentes.

Palavras-chave: Inflamação; Receptor PAR-1; Agentes Moduladores de Angiogênese.

ABSTRACT

Ramalho-Lucas PD. Type 1 protease-activated receptor (PAR₁) inhibition on periodontal disease and repair. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

PAR₁ cell signaling has been shown to be involved in several pathophysiological responses including platelet activation, tumor growth, inflammation and metastasis. Based on this, the aim of the present study was to evaluate the influence of Parstatin, a drug that presents a biological effect opposed to that of PAR₁ receptor activation, on inflammation induction and repair processes. Rats were subjected to cotton ligature-induced periodontitis bilaterally on the second upper molar teeth. Seventy-two rats were randomly assigned to 9 groups (n=8/group) and received ligatures and injection of vehicle or Parstatin for 7 or 14 days for both inflammation and repair induction. After that, the animals were sacrificed and their maxilla removed, dissected and divided in two for histologic and radiographic evaluation to characterize inflammatory cell infiltrate and bone loss around teeth.

Key words: Inflammation; Receptor, PAR-1; Angiogenesis Modulating Agents.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

PARs: localização, ativação e função

Os receptores ativados por protease (PARs) pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G heterotrimérica (Adams et al.¹, 2011). Conforme ilustrado nas Figuras 1A e 1B, proteases são responsáveis pela proteólise do domínio extracelular terminal-N do PAR, resultando em um novo terminal, o qual se liga em um sítio específico no próprio receptor, desta forma, ativando-o (Nieman et al.³⁵, 2008; Ossovskaya, Bunnet³⁷, 2004; Cocks et al.¹⁹, 2000; Coughlin¹³, 2000; Coughlin¹², 1999).

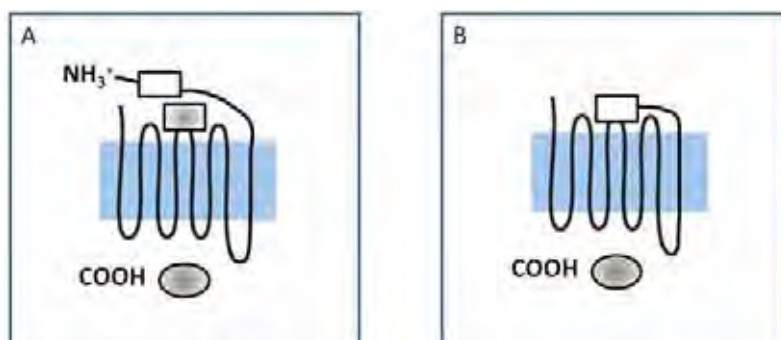


FIGURA 1 - Mecanismos de ativação do receptor ativado por protease. A Figura 1A representa o receptor em uma forma “inativa”, esperando a clivagem de seu domínio extracelular terminal-N em um sítio específico (lado esquerdo, caixa branca). Após a clivagem enzimática, o domínio extracelular terminal-N é exposto e se liga a um local específico no receptor, ativando-o (Figura 1B).

Até o presente momento, quatro membros da família dos receptores PAR foram identificados. PAR₁, PAR₃ e PAR₄ são ativados por trombina (Ossovskaya, Bunnet³⁷, 2004; O’Brien et al.³⁶, 2001; Macfarlane et al.³⁰, 2001; Coughlin¹³, 2000; Coughlin¹², 1999). PAR₂ é ativado por tripsina, triptase produzida por

mastócitos, proteinase tipo 3 do neutrófilo, fator VIIa/fator Xa, proteinase tipo 1 da membrana, ou proteases produzidas pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (Nieman³⁵, 2008; Chiu⁸, 2007). Peptídeos sintéticos seletivos, com as mesmas sequências do terminal-N, podem ativar os receptores através de ligação direta ao corpo do receptor, sem a necessidade de proteólise (Cocks et al.¹⁹, 2000) (Figura 2).

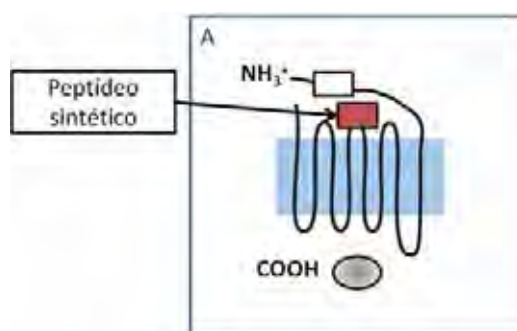


FIGURA 2 - Peptídeos sintéticos podem também ativar o PAR ligando diretamente ao receptor (caixa vermelha) sem necessidade de clivagem enzimática do mesmo.

Com exceção do PAR₃, todos os demais receptores possuem seus peptídeos agonistas seletivos. PAR₁, PAR₂ e PAR₄ podem ser ativados não-enzimaticamente por TFLLR-NH₂, SLIGRL-NH₂, e GYPGQV-NH₂, respectivamente (Ossovskaya, Bunnet³⁷, 2004). Além de poder ser ativado por trombina, PAR₁ pode também ser ativado por proteína C reativa e metaloproteinase de matriz tipo 1 (MMP-1) (Chen et al.⁶, 2008). Esta ativação leva à produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), que promovem a formação de novos vasos sanguíneos (propriedade angiogênica).

Apesar de demonstrarem estruturas similares e mecanismos comuns de ativação, os PARs possuem localização tecidual e funções diferentes. PAR₁ pode ser encontrado nas plaquetas, endotélio, epitélio, fibroblastos, miócitos, neurônios, e astrócitos, e parece desempenhar um papel importante na deposição de matriz vascular após injúrias. PAR₃ e PAR₄ são encontrados nas plaquetas, endotélio, miócitos, e astrócitos, e estão envolvidos na formação de coágulos e na embolia pulmonar. PAR₂ parece estar envolvido na migração de leucócitos, reação alérgica das vias aéreas e inflamação de articulações, pele e rins (Ossovskaya, Bunnet³⁷, 2004).

A clivagem do PAR₁ gera um fragmento denominado Parstatin na superfície celular. Este fragmento penetra na célula por um mecanismo ainda desconhecido, possivelmente através de um transportador da membrana celular ou por mediação lipídica. Uma vez no meio intra-celular o Parstatin inibe a proliferação da célula e induz apoptose (Figura 3). Em um estudo in vitro recente utilizando aortas de ratos demonstrou-se que o Parstatin tem a capacidade de inibir a produção de VEGF e bFGF, ou seja, uma ação oposta àquela do PAR₁ ativado (Zania et al.⁴⁹, 2009).

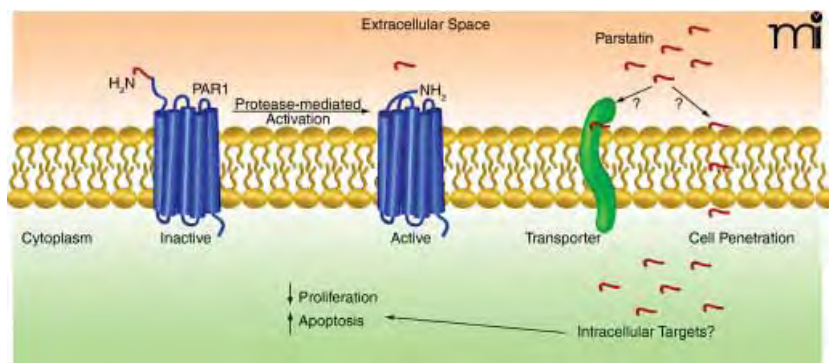


FIGURA 3 - Processamento do Parstatin pelo receptor ativado por protease (PAR₁). Proteases serinas ativam PAR₁ pela clivagem de um fragmento de 41 aminoácidos e induzindo a ativação de um ligante. O peptídeo clivado, Parstatin, localiza-se na superfície celular e é internalizado possivelmente através de um transportador da membrana celular ou por mediação lipídica. O Parstatin subsequentemente inibe a proliferação celular e induz apoptose (Retirado de Duncan & Kalluri¹⁵, 2009).

PAR₁: inflamação e reparo

A ativação do PAR₁ pelas proteases, particularmente a trombina, um produto da coagulação, dispara várias respostas que induzem a inflamação. Elas incluem a mobilização de P-selectinas; produção de quimiocinas e outras citocinas; expressão de moléculas de adesão endotelial para integrinas dos leucócitos; indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e produção de prostaglandinas; produção de fator inibidor de plaquetas (PAF) e óxido nítrico (NO); e mudanças no formato endotelial (Ramachandran, Hollenberg⁴⁰, 2008; Holzhausen²¹, 2005; Loubakos et al.²⁸, 2001; Coughlin et al.¹³, 2000; Coughlin et al.¹², 1999). Essas respostas promovem o recrutamento de leucócitos e muitas outras reações da inflamação. Devido à coagulação e à inflamação poderem iniciar um círculo vicioso de amplificação, a interferência com a coagulação é uma estratégia terapêutica potencial para a doença inflamatória sistêmica vista com infecções

bacterianas, inclusive as disseminadas (Ramachandran, Hollenberg⁴⁰, 2008; Coughlin et al.¹³, 2000).

Apesar de não existirem muitos estudos relacionando diretamente o PAR₁ com a doença periodontal, que representa uma resposta imuno-inflamatória, sabe-se que a atividade angiogênica apresenta um papel fundamental no processo de inflamação e reparo tecidual. A atividade plaquetária promove a liberação de fatores de crescimento como VEGF, bFGF e endostatina, que podem atuar tanto acelerando como diminuindo o tempo do reparo tecidual (Coimbra et al.¹⁰, 2010; Guimarães et al.²⁰, 2007; Carmeliet⁵, 2003; Papetti, Herman³⁸, 2002; Conway et al.¹¹, 2001).

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Função do PAR1 nas células

Hou et al.²² em 1998 avaliaram o papel dos receptores ativados por protease (PARs) na expressão de Interleucina-6 (IL-6) utilizando um modelo in vitro com fibroblastos gengivais humanos (HGF). Os autores trataram estas culturas celulares com trombina e um peptídeo sintético (SFFLRN), que são agonistas de PAR₁, com LPS (lipopolissacarídeo) e Sulfato de Polimixina B, agonistas de PAR₂. Realizaram a análise de imuno-fluorescência indireta e *Northern Blotting* para avaliar a expressão destes receptores e ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para ver a expressão de IL-6 nestas células. As células HGF expressaram PAR₁, porém não expressaram PAR₂. A ativação de PAR₁ por trombina estimulou a secreção de IL-6 pelos fibroblastos. SFFLRN também estimulou a secreção de IL-6, porém em níveis mais baixos comparados aos níveis da ativação por trombina. Os autores concluíram que a ativação do PAR₁ tem um papel importante na doença periodontal devido à presença de IL-6, uma citocina pró-inflamatória.

Vergnolle et al.⁴⁶ em 1999 avaliaram a ação pró e anti-inflamatória da trombina e seus distintos papéis na ativação do PAR₁ utilizando um modelo de inflamação em pata de rato. A inflamação foi induzida pela injeção local de substâncias teste nas patas traseiras dos animais. As substâncias teste utilizadas foram trombina, outros dois peptídeos ativadores seletivos de PAR₁, Cit-NH₂ e TF-NH₂ e o peptídeo de controle FSLLRY-NH₂ (FS-NH₂). As alterações nas

características estruturais de cada pata foram analisadas através de cortes histológicos. A injeção de trombina resultou no desenvolvimento de edema que persistiu por mais de 6 horas. As injeções contendo Cit-NH₂ e TF-NH₂ também resultaram em edema significativo. Nestes dois últimos casos, o edema foi significativamente maior que o edema causado pela injeção da substância controle e os cortes histológicos mostraram uma desorganização dos tecidos. Nos animais que receberam uma co-administração de trombina e Cit-NH₂, o edema foi menor que o observado nos animais tratados apenas com Cit-NH₂ revelando um efeito anti-inflamatório da trombina. Com estes resultados os autores concluíram que a trombina pode exercer efeitos pró e anti-inflamatórios no modelo de edema de pata de rato.

Em 2001, Andrade-Gordon et al.² investigaram o efeito antitrombótico do peptídeo mimético RWJ-58259, um potente antagonista de PAR₁. Os modelos experimentais utilizados neste estudo incluindo cultura celular de células do músculo liso de aorta e plaquetas, modelo de trombose in vivo utilizando cobaias e por final um modelo de reestenose em ratos. Para avaliar a agregação plaquetária foi utilizado plasma rico em plaquetas (PRP) preparado através de sangue humano, de cobaias e de ratos. A agregação plaquetária foi iniciada com a aplicação de trombina e SFLLR-NH₂. As culturas celulares foram tratadas com trombina. Para avaliar a mobilização de cálcio nestas células foi realizado teste de fluorescência e a expressão de IL-6 foi avaliada por ELISA. O modelo de trombose foi obtido pela canulação da artéria carótida esquerda e da veia jugular direita com um tubo de silicone promovendo um desvio extracorpóreo e a instalação de uma ligadura feita com fio de algodão. A administração de RWJ-

58259 foi feita 15 minutos após a estabilização do quadro cirúrgico. O modelo de reestenose foi obtido com a colocação de um cateter balão na carótida dos ratos que foi inflado e desinflado por 3 vezes. RWJ-58259 foi administrado na camada adventícia da carótida. Os resultados mostraram que a agregação plaquetária induzida por trombina foi inibida pelo acréscimo de RWJ-58259 nas plaquetas humanas. Nas células da musculatura lisa da carótida, RWJ-58259 inibiu a mobilização de cálcio e a liberação de IL-6 induzidas por trombina. No modelo de trombose in vivo, a administração de RWJ-58259 diminuiu o peso do trombo quando comparado ao grupo controle. No modelo de reestenose, a inibição da ativação do PAR₁ por trombina consequente da administração de RWJ-58259 mostrou reduzir a injúria vascular. Os autores concluíram que RWJ-58259 apresenta características antitrombóticas e que a inibição do PAR₁ pode apresentar potencial terapêutico em injúrias vasculares.

Em 2001, Kawabata et al.²⁵ mostraram que agonistas de PAR₁ e PAR₂ modulam o trânsito gastrointestinal em camundongos. Os autores administraram um marcador por via oral nos animais e os sacrificaram após 20 minutos. O trato gastrointestinal foi removido e o comprimento do intestino delgado percorrido pelo marcador foi mensurado. As drogas administradas foram: peptídeo agonista de PAR₂ SLIGRL-NH₂, peptídeo de controle inativo de PAR₂ LSIIGRL-NH₂, peptídeos agonistas de PAR₁ SFLLR-NH₂ e TFLLR-NH₂, e o peptídeo de controle inativo de PAR₁ FSLLR-NH₂. Estes peptídeos foram administrados em várias doses por via intraperitoneal e após 1 minuto foi administrado um inibidor de peptidase (Amastatin) seguido pela administração do marcador gastrointestinal. Os resultados mostraram que ao administrar o SLIGRL-NH₂ combinado com o

Amastatin, o trânsito gastrointestinal foi facilitado; porém, quando administrado apenas o SLIGRL-NH₂ não houve efeito significativo. Por outro lado, administração de FS-NH₂ combinado com o Amastatin, não surtiu nenhum efeito no trânsito gastrointestinal. Já a administração de SFLLR-NH₂ combinado com Amastatin, causou um aumento significativo no trânsito gastrointestinal, embora quando administrado sem o pré-tratamento com Amastatin, não houve efeito significativo. FS-NH₂ também não mostrou efeito significativo no trânsito gastrointestinal. Estes resultados mostram que os Receptores PAR₁ e PAR₂ modulam o trânsito gastrointestinal in vivo e ressaltam a importância do papel destes receptores neste sistema.

Em 2001, Loubakos et al.²⁸ avaliaram se a protease bacteriana RgPB pode ativar PARs em células epiteliais gengivais humanas (KB) gerando como resposta a secreção de citocinas por estas células em um modelo in vitro. Foram utilizadas células de linhagem e tecido gengival humano para realização do experimento, em ambos os casos foi feito o tratamento com RgPB. Para analisar a expressão ou não destes receptores, foram feitas análises de transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e imuno-histoquímica. As análises de RT-PCR mostraram a expressão de PAR₁, PAR₂ e PAR₃. A análise imuno-histoquímica mostrou uma forte expressão de PAR₁ e PAR₂, uma expressão mais leve de PAR₃ e uma baixa ou inexistente expressão de PAR₄. PAR₁ e PAR₂ foram marcados na camada epitelial, porém, PAR₁ tem sua marcação bem distribuída e apresenta um declínio quando as células vão se aproximando da camada escamosa da gengiva enquanto PAR₂ tem sua marcação mais concentrada forte em ambas as camadas. A Expressão de PAR₃ se assemelha à expressão de PAR₁ em distribuição, porém

com uma marcação mais fraca. Isto indica que ambos, PAR₁ e PAR₂ são fortemente expressos no epitélio gengival, embora seja esperado que PAR₂ seja o receptor que tem o primeiro contato com as bactérias no epitélio oral. Os resultados mostram que ambos, PAR₁ e PAR₂ estão presentes na superfície das células KB e podem ser ativados pela protease bacteriana RgPB. A clivagem destes PARs e a consequente regulação na secreção de IL-6 podem contribuir para a inflamação local relacionada à bolsa periodontal patológica e à propagação da condição crônica inflamatória presente nas doenças periodontais.

Em 2003, Chin et al.⁷ avaliaram a capacidade do PAR₁ em alterar a permeabilidade epitelial, se este efeito é decorrente de apoptose de enterócitos que ocasiona o rompimento da junção entre as células do epitélio intestinal. Foi utilizado um modelo in vitro com cultura de células SCBN (linhagem de células epiteliais intestinais indiferenciadas) que foram tratadas com TFLLR-NH₂ e como controle inativo de PAR₁ (RLLFT-NH₂). Também foi realizado um estudo in vivo com camundongos C57Bl6 onde um cateter foi introduzido pelo ânus dos animais e foram feitas infusões na região de cólon contendo TFLLR-NH₂ e RLLFT-NH₂. Para avaliar a apoptose das células, realizaram teste de fluorescência e ELISA e para analisar a permeabilidade dos intestinos in vivo, foi realizado imuno-histoquímica com marcadores para caspase-3. Os resultados mostraram que agonistas de PAR₁ induziram a apoptose de enterócitos e esta apoptose levou ao aumento da permeabilidade epitelial. No estudo in vivo, a imuno-histoquímica mostrou um aumento nos níveis de caspase-3 nos animais tratados com TFLLR-NH₂ confirmando o aumento da permeabilidade do epitélio sobre o efeito do

agonista de PAR₁. Os autores concluíram que a apoptose induzida por PAR₁ está associada com o aumento da permeabilidade no epitélio intestinal in vivo.

Em 2003, Derian et al.¹⁴ investigaram o efeito do RWJ-58259 na formação de trombo subsequente de injúria eletrolítica em primatas. Eletrodos foram introduzidos nas carótidas dos animais para que se conseguissem um modelo de trombose carotídea eletrolítica. A droga e o veículo foram administrados por via endovenosa e após a administração das drogas, aplicaram uma corrente elétrica nos eletrodos para induzir a oclusão trombótica da artéria. A oclusão foi definida pela diminuição do fluxo sanguíneo na artéria. Amostras de sangue foram coletadas durante e depois da injúria e foi preparado PRP para avaliação da agregação plaquetária in vitro. As plaquetas foram tratadas com RWJ-58259 5 minutos antes da estimulação com trombina. Para avaliação histológica das aortas dissecadas foi realizada análise imuno-histoquímica com marcadores de fibrina. A expressão de PARs foi avaliada por RT-PCR e mostraram a expressão de PAR₁ e PAR₄ pelas plaquetas. Foi notada uma diminuição no grau de oclusão das artérias que receberam a injúria eletrolítica após a administração de RWJ-58259. As análises histológicas das aortas mostraram uma diminuição no número de plaquetas nos trombos dos animais tratados com RWJ-58259. Os autores concluíram que o RWJ-58259 exerceu uma função terapêutica no modelo de trombose eletrolítica.

Chiu et al.⁸, 2007, mostraram que o alérgeno imuno-dominante Pen c 13 induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais das vias aéreas (HAECs) pela ativação de PAR₁ e PAR₂, através da via de sinalização Ca⁺. Foi utilizado um modelo in vitro onde as células HAECs da linhagem A549 foram

tratadas inicialmente com Pen c 13 em diferentes concentrações, com SFLLR-NH₂, com SLIGKV (agonista de PAR₂) posteriormente e com antígenos de PAR₁ e PAR₂. A expressão de IL-8 foi avaliada por citometria de fluxo, ELISA e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados mostraram que Pen c 13 induziu a secreção de IL-8 e aumentou a expressão de PAR₁ e PAR₂ pelas HAECs. Nas culturas tratadas com antígenos de PAR₁ e PAR₂, a expressão de IL-8 foi significativamente reduzida. Os autores concluíram que PAR₁ e PAR₂ são expressos nas superfícies das HAECs. Sua ativação está relacionada com doenças alérgicas comuns como asma e podem ser alvos terapêuticos em doenças respiratórias.

Em 2008, Chen et al.⁶ avaliaram a necessidade da ativação do PAR₁ para o recrutamento de leucócitos dependente de MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos) in vivo utilizando um modelo de rejeição de enxerto xenógeno através de transplante de coração entre camundongo e rato. Antes de realizar os transplantes, os animais receptores receberam administração endovenosa de agonistas e antígenos de PAR₁. Para avaliar a presença de MCP-1 foi realizado teste ELISA e para verificar a presença de Leucócitos nos tecidos rejeitados foi feita cultura de células. A inibição de PAR₁ inibiu a produção de MCP-1 nos corações doados e a ativação de PAR₁ aumentou a produção de MCP-1 nestes enxertos mostrando que a produção de MCP-1 nos órgão doados é dependente da ativação de PAR₁. Esta ativação também se mostrou necessária para o recrutamento de leucócitos dependente de MCP-1 avaliada pela presença dos mesmos nas culturas celulares feitas posteriormente. Os autores concluíram que o

recrutamento de leucócitos pela ativação de PAR₁ é dependente da produção de quimiocinas como MCP-1.

Rohani et al.⁴², 2010, estudaram os diferenciais de sinalização de PAR₁ e PAR₂ mediados pela resposta imune inata na indução de CXCL3, CXCL5 e CCL20 pelas vias de sinalização ERK, p38 e PI3K/Akt. Para realização do estudo foi realizada cultura de queratinócitos gengivais humanos isolados (HOKs). As células receberam tratamento com trombina e tripsina para estimular a ativação de PAR₁ e PAR₂ respectivamente. Foi feito RT-PCR para verificar a expressão de CXCL3, CXCL5, CCL20 e GAPDH. Para mensurar a secreção de CXCL5 e CCL20, e para avaliar a fosforilação de p38 e ERK1/2 foi feito teste de ELISA. A expressão total e fosforilada de kinases nos grupos de células tratadas ou não foi avaliada por *Western-Blotting*. Os resultados mostraram que a ativação de PARs modularam a fosforilação de p38 e ERK1/2 nas células HOKs e os marcadores de resposta imune inata induzida pela ativação de PAR₁ e PAR₂ foram regulados por estas duas vias de sinalização. A expressão imune inata e a expressão de CXCL5 em resposta a ativação de PAR₁ e PAR₂ foi reforçada pela inibição de PI3K/Akt. A inibição de PI3K está associada com o decréscimo na fosforilação de ERK1/2 e aumento na fosforilação de p38. Os autores concluíram que as proteases mediadoras da ativação de PAR₁ e PAR₂ são diferentemente sinalizadas pelas vias de cascata das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK).

Em 2010, Wee et al.⁴ avaliaram o papel da expressão de PAR₁ e PAR₂ na resposta inflamatória causada por *helicobacter pylori* (*H. pylori*). Foram utilizados camundongos *knockout* para realização do estudo e camundongos comuns como controle. Os animais foram infectados por via intra-gástrica com

uma suspensão de *H. pylori* e os níveis de infecção foram avaliados pela contagem de colônias formadas no estômago dissecado dos animais. Foi realizada punção cardíaca no momento da eutanásia e a presença de anticorpos de *H. pylori* no soro foi avaliada por ELISA. Culturas primárias das células gástricas dos animais foram feitas para análise das citocinas presentes. A Expressão de PAR₁ foi analisada por RT-PCR. Os resultados mostraram que os camundongos *knockout* para PAR₁ apresentaram uma diminuição no número de colônias de *H. pylori* formadas. A infecção dos camundongos por esta bactéria levou a uma elevação no número de anticorpos da mesma presentes no sangue dos animais. A contaminação por *H. pylori* aumentou a expressão de PAR₁ e diminuiu a expressão de PAR₂. Os autores concluíram que PAR₁ age protegendo o hospedeiro contra gastrite induzida pela bactéria *H. pylori*.

Em 2011, Falker et al.¹⁶ mostraram que diferenças na regulação da sinalização por PARs em plaquetas humanas se cruzam, e que a sinalização por PAR₄ elimina a diminuição na regulação de PAR₁. Para este estudo, utilizaram PRP, o trataram com SFLLRN e AYPGKF (peptídeo ativador de PAR₄) e avaliaram a agregação plaquetária com um aparelho que avalia a quantidade de luz que passa por estas plaquetas (*Chrono-Log Dual Channel lumi-aggregometer [Model 560]*). A expressão de PAR₁ na superfície das células foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que as plaquetas tratadas com SFLLR tiveram um acréscimo na sua taxa de agregação enquanto as plaquetas tratadas com AYPGKF não sofreram efeito nesta taxa. Nas plaquetas cuja sensibilização por PAR₁ estava em queda e conseqüentemente a taxa de agregação estava diminuída, o tratamento com AYPGKF fez com que houvesse uma re-

sensibilização do PAR₁ restabelecendo a resposta de agregação das plaquetas. Os autores concluíram que apesar de serem sinalizações diferentes, a co-expressão de PAR₁ e PAR₄ são importantes no processo de agregação plaquetária uma vez que a sinalização por PAR₄ restabelece a sinalização por PAR₁ responsável pela agregação das plaquetas, quando a mesma está diminuindo.

Veiga et al.⁴⁵, 2011, avaliaram a expressão de PAR₁ nos quatro principais tipos de leucemias, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielóide aguda (AML) e leucemia mielóide crônica (CML). Para avaliar o padrão de expressão de proteínas de PAR₁, foram coletadas 61 amostras de sangue de pacientes com os diferentes tipos de leucemia. A expressão de PAR₁ foi analisada em linfócitos saudáveis (controle) e em linfócitos de pacientes com as leucemias por citometria de fluxo. As análises mostraram que linfócitos de pacientes com CLL expressaram PAR₁ em quantidades similares aos linfócitos de pacientes saudáveis. Por outro lado, houve um acréscimo na expressão de PAR₁ nos linfócitos de pacientes com ALL comparados aos de pacientes com CLL e saudáveis. Nas amostras de CML, houve um aumento na expressão de PAR₁ quando comparadas com a amostra de pacientes saudáveis. Nas amostras AML também houve um aumento significativo na expressão de PAR₁ em comparação à amostra de controle. Os autores concluíram que a expressão de PAR₁ é significativamente elevada nos casos de leucemias mais agressivas sugerindo um papel importante deste receptor nas malignidades hematológicas agressivas.

Ação do Parstatin nos processos de angiogênese e inflamação

Em 2009, Zania et al.⁴⁹ avaliaram a inibição do processo de angiogênese por um fragmento peptídico resultante da clivagem de PAR₁ por trombina denominado Parstatin. Foram utilizados três modelos de estudo, um in vitro realizado com células epiteliais provenientes de veias umbilicais humanas (HUVECs) e dois modelos in vivo, um utilizando membrana corioalantóide (CAM) de embrião de frango e outro utilizando artéria aorta de rato. Os três modelos experimentais receberam tratamento com fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), Parstatin em diferentes concentrações e veículo no grupo de controle. Os resultados mostraram que a aplicação de Parstatin na CAM de embrião de frango resultou em inibição significativa nos níveis de angiogênese e esta inibição foi mais notável nos modelos tratados com VEGF e bFGF. No modelo de aorta de rato, Parstatin inibiu a formação de micro-vasos nos modelos tratados com VEGF e bFGF em certas doses. No modelo in vitro, as células HUVECs apresentaram uma diminuição na taxa de crescimento e divisão na presença de Parstatin. Os autores concluíram que Parstatin é um potente inibidor de angiogênese derivado da trombina mostrando que a trombina pode exercer tanto funções pró quanto anti-angiogênicas.

Em 2009, Strande et al.⁴⁴ avaliaram as propriedades cardioprotetoras de Parstatin na injúria por isquemia e reperfusão após infarto em ratos. Para conseguir o modelo de isquemia foi realizada toracotomia nos animais e uma ligadura foi posta na artéria coronária. Os corações foram submetidos a 30

minutos de isquemia seguidos de 120 minutos de reperfusão. Parstatin foi administrado 15 minutos antes da indução de isquemia ou 10 segundos após a reperfusão. Uma área de infarto foi selecionada para as futuras avaliações. Para avaliar os efeitos cardioprotetores de Parstatin *in vitro*, os autores realizaram perfusão retrograda sobre constante pressão (85mmHg) em corações excisados. Os corações foram submetidos a 30 minutos de isquemia regional e 180 minutos de reperfusão. Os corações do grupo A não receberam tratamento enquanto os do grupo B foram tratados com Parstatin em diferentes concentrações. Ao final do experimento foram feitas análises de *immunoblotting* e protocolo de vaso dilatação de micro vasos. Os resultados mostraram uma diferença significativamente menor na área de infarto nos grupos que receberam Parstatin tanto no estudo *in vivo* como no *in vitro*. Os autores concluíram que Parstatin apresenta propriedades cardioprotetoras durante a injúria nos processos de isquemia e reperfusão e causa vasodilatação em artérias de ratos isoladas.

Em 2010, Huang et al.²³ avaliaram o efeito de Parstatin em modelos de neovascularização e inflamação. Estes modelos obtidos através da aplicação de laser na retina, através de retinopatia isquêmica induzida por oxigênio ambos em camundongos, e pela cauterização química da córnea em ratos. Após os processos de indução de neovascularização, injeções intra-vitreaís contendo Parstatin ou veículo foram feitas. A formação de novos micro-vasos e a presença de infiltrado inflamatório foram avaliados histopatologicamente. Para avaliar a presença de leucócitos na retina, injeções de VEGF e de VEGF combinado com Parstatin foram realizadas, e as análises quantitativas foram feitas por contagem de leucócitos aderidos nos vasos das retinas. Nos três modelos estudados, os grupos

que receberam Parstatin apresentaram diminuição na formação de novos vasos. No modelo de leucocitose induzida por VEGF, o grupo que recebeu Parstatin mostrou uma diminuição no número de leucócitos aderidos aos vasos. Os autores concluíram que Parstatin suprimiu a neovascularização retinal, coroidal e córnea e reduziu o recrutamento de células inflamatórias nas lesões oculares mostrando que Parstatin pode apresentar características terapêuticas nos casos de doenças neovasculares e inflamatórias oculares.

Routhu et al.⁴³, 2010, avaliaram a eficácia de Parstatin em oferecer proteção contra isquemia do miocárdio e injúria por reperfusão em ratos. O modelo de infarto utilizado foi o mesmo descrito por Strande et al.⁴⁴ em 2009. Parstatin foi injetado em diferentes concentrações por via endovenosa por um cateter instalado na artéria carótida esquerda dos animais. Uma área de risco a infarto foi determinada. Os grupos tratados com Parstatin apresentaram uma menor área de risco a infarto que os ratos sem tratamento ou que receberam apenas veículo. Os autores concluíram que Parstatin é um efetivo agente de proteção durante isquemia e reperfusão do miocárdio em ratos.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi verificar a importância do receptor PAR₁ no desenvolvimento e reparo do processo inflamatório nos tecidos periodontais.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da inibição do PAR₁ sobre a destruição óssea alveolar produzida pela indução de periodontite experimental;
- Avaliar a intensidade do processo inflamatório provocado nos tecidos periodontais na presença e ausência de droga inibidora de PAR₁;
- Avaliar a influência da inibição do PAR₁ sobre o reparo dos tecidos periodontais.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman), machos, com idade aproximada de 8 semanas e com peso médio de 250g provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara. Os animais em grupos de 5, foram acomodados em gaiolas de polipropileno e mantidos em temperatura controlada (22-25°C), com ciclos de claro e escuro (12/12 horas), alimentados com ração granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum* no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), processo nº 20/2011, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo 1).

A amostra foi aleatoriamente distribuída em 9 grupos experimentais sendo que 4 grupos foram submetidos ao estudo da ação do Parstatin sobre a indução de doença periodontal experimental, 4 grupos foram utilizados para o estudo da ação do Parstatin sobre a reparação da doença peridontal experimental e 1 grupo controle que não recebeu qualquer manipulação incluindo tratamento com Parstatin ou indução da doença periodontal (DP).

Avaliação do Parstatin sobre a indução da doença periodontal experimental

Neste estudo foi utilizado um modelo de indução de doença periodontal por meio da colocação de ligadura ao redor dos segundos molares superiores, bilateralmente.

Para a colocação da ligadura, os animais foram submetidos à anestesia geral (0,08 mL de Ketamina e 0,04 mL de cloridrato de Xilasina por 100g de peso corporal). Após anestesia, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada para permitir uma manutenção adequada de abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da maxila. Com o auxílio de instrumental adequado, um fio de algodão n° 30 foi posicionado na região de sulco gengival ao redor dos segundos molares superiores dos lados direito e esquerdo. Neste modelo de indução de doença periodontal a ligadura atua como irritante gengival e ao mesmo tempo favorece o acúmulo de bactérias (Bezerra et al.⁴, 2000; Johnson²⁴, 1975). As ligaduras foram checadas quando os ratos foram sacrificados.

Após a colocação da ligadura, cada rato recebeu uma injeção contendo 5µl de *Phosphate Buffer Saline* (PBS), solução utilizada como veículo, ou 3µg de Parstatin diluído em 5µL de PBS perfazendo-se volume total de 0,6µg/µL por injeção (Huang²³, 2010). Essas injeções foram realizadas na mucosa palatina na região mesial dos segundos molares superiores. Os animais dos grupos 2 e 4 receberam uma injeção contendo, respectivamente, veículo e Parstatin imediatamente após a instalação das ligaduras, uma segunda injeção 7 dias após a indução da doença periodontal e foram sacrificados 24 horas após a última

injeção. Os animais dos grupos 3 e 5 receberam uma injeção contendo, respectivamente, veículo e Parstatin imediatamente após a instalação das ligaduras, uma segunda injeção após 7 dias da instalação das ligaduras e uma terceira injeção após 14 dias da instalação das ligaduras (Figura 4). Os animais foram sacrificados 24 horas após a última injeção.

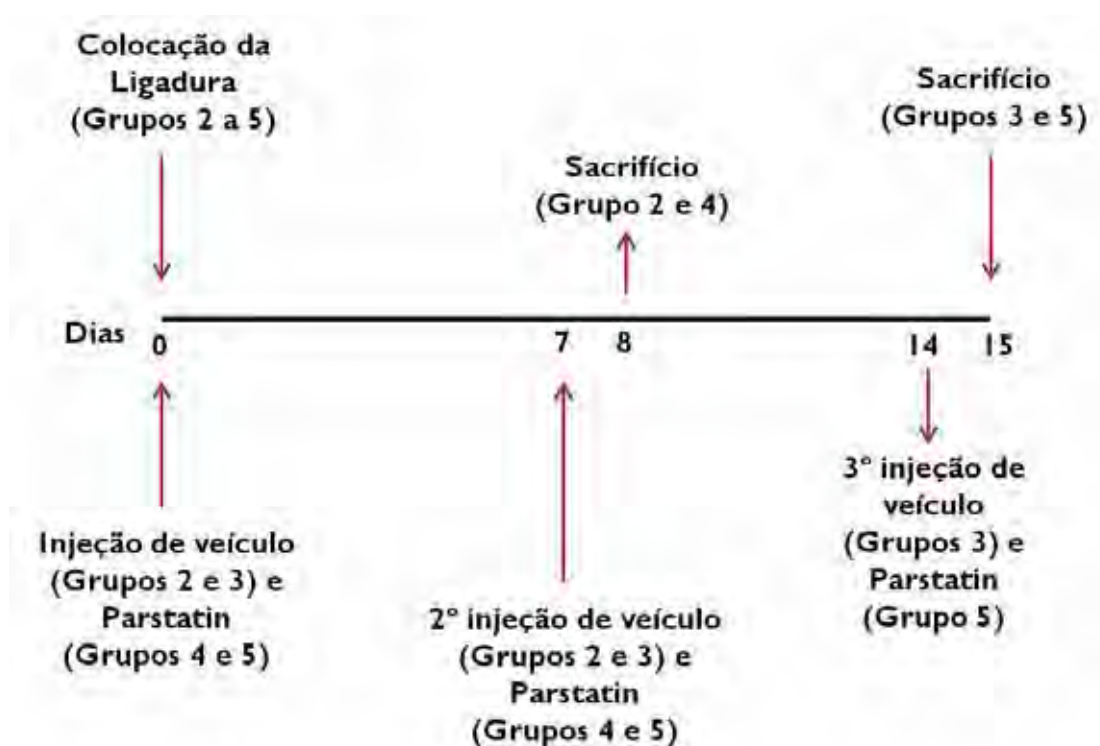


FIGURA 4 - Esquema mostrando o delineamento experimental durante a indução da doença periodontal e tratamento com PBS e Parstatin.

Avaliação do Parstatin sobre o processo de reparo após a indução da doença periodontal experimental

Para avaliação da ação do Parstatin sobre o processo de reparo dos tecidos periodontais as ligaduras foram removidas no intuito de retirar o irritante gengival e ao mesmo tempo não favorecer o acúmulo de bactérias. Nesse sentido, quatro grupos de ratos (grupos 6 a 9) foram submetidos à indução da doença periodontal experimental e no 7^o dia as ligaduras foram retiradas para que se iniciasse o processo de reparo destes tecidos. Os animais dos grupos 6 e 8 receberam uma injeção contendo, respectivamente, veículo e Parstatin imediatamente após a instalação das ligaduras e uma segunda injeção no momento de retirada das ligaduras após 7 dias sendo sacrificados 24 horas após a última injeção para avaliação do reparo dos tecidos periodontais neste período. Os animais dos grupos 7 e 9 receberam uma injeção contendo, respectivamente, veículo e Parstatin imediatamente após a instalação das ligaduras, uma segunda injeção no momento da retirada das ligaduras após 7 dias e uma terceira injeção passados mais 7 dias sendo sacrificados após 24 horas para avaliação do reparo dos tecidos periodontais neste período. A concentração e volume das soluções injetadas foram as mesmas citadas anteriormente (Figura 5).

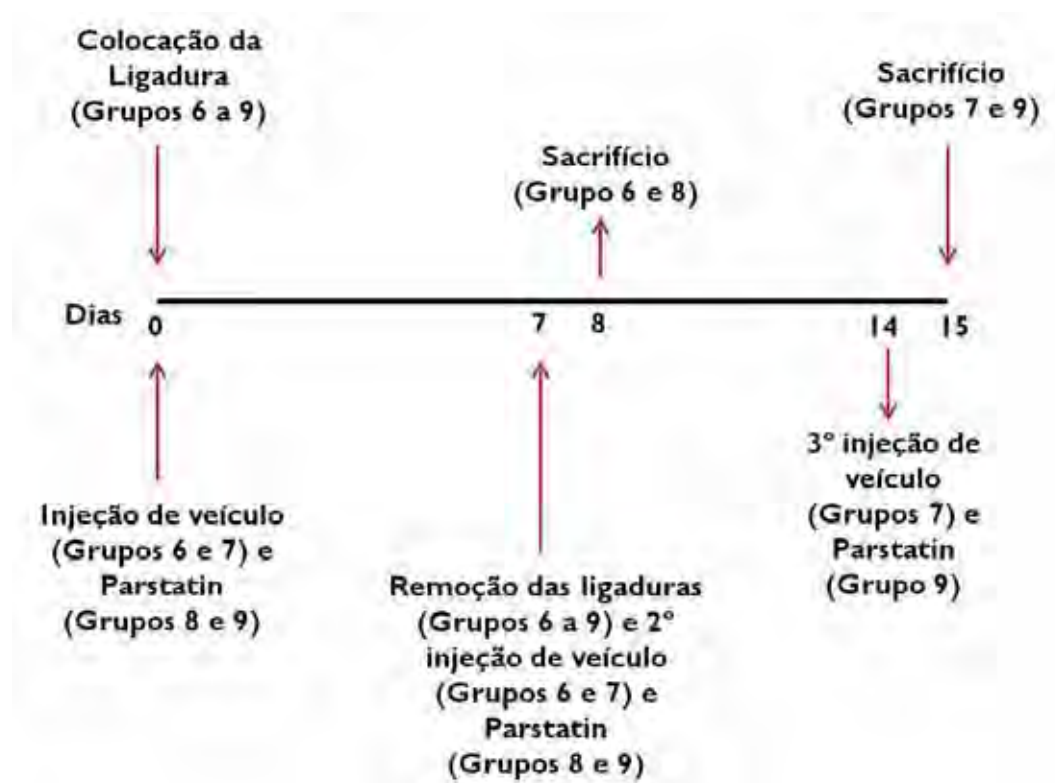


FIGURA 5 – Esquema mostrando o delineamento experimental durante o processo de reparo dos tecidos periodontais após o tratamento com PBS e Parstatin.

Coleta de Material e Análises

Após os períodos experimentais estabelecidos os animais foram sacrificados por overdose de anestésico. Posteriormente ao sacrifício as maxilas dos animais foram removidas e separadas em duas hemi-arcadas através de incisão na região da sutura palatina, totalizando 16 peças por grupo. As hemimaxilas do lado direito foram utilizadas para processamento histológico e as do lado esquerdo foram utilizadas para obtenção de material para a análise de microtomografia computadorizada (μ CT).

Análise Histológica Descritiva

As heimaxilas do lado direito, destinadas à análise histológica, foram fixadas em formol 10% por 48h. Um agente descalcificante rápido contendo EDTA, tartarato de sódio e potássio, ácido clorídrico e água deionizada foi utilizado para uma descalcificação em 10 horas e, em seguida, as peças foram incluídas em parafina. Cortes seriados de 5 μ m de espessura foram obtidos no plano transversal, montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H/E). Estes cortes foram utilizados para análise descritiva feita por um examinador calibrado.

Microtomografia computadorizada – μ CT

Após o sacrifício dos animais, as hemimaxilas do lado esquerdo foram removidas, fixadas em formol a 10% durante 48 horas e em seguida transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. As amostras foram escaneadas através de um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium).

Foram utilizados os seguintes parâmetros da μ CT: o tamanho da imagem em pixel foi de 2000 x 1336; a espessura dos cortes foi de 12 μ m; a magnificação da imagem foi de 10x; a voltagem do tubo de raios-X foi de 50kV e o feixe foi de 495 μ A e a corrente elétrica foi ajustada para 0.1mA. As reconstruções tridimensionais das imagens foram feitas utilizando o software de reconstrução (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan N. V. Belgium).

Depois de serem reconstruídas as imagens foram reorientadas em três planos, frontal, coronal e transaxial em um software específico (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium) para possibilitar um alinhamento uniforme da posições anatômicas mesial-distal, vestibular-palatina e medial e lateral resultando em uma padronização das imagens que serão utilizadas para a análise volumétrica posteriormente (Figura 6).

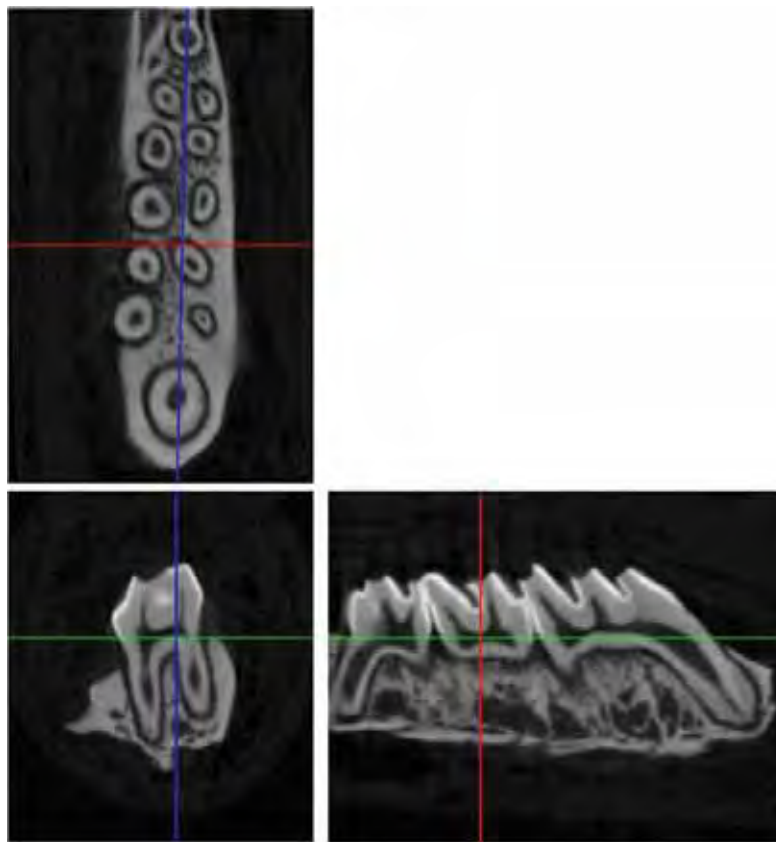


FIGURA 6 – Imagem do software Dataviewer mostrando os três posicionamentos necessários para a padronização das imagens a serem analisadas volumetricamente.

Para mensuração volumétrica das imagens, foi utilizada a uma modificação da metodologia proposta por Park et al.³⁹, (2007). Estas mensurações foram feitas através de um software específico (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium), seguindo a seleção de uma região de interesse (ROI – region of

interest) tridimensional que foi padronizado e utilizado em todas as imagens. O examinador utilizou marcações morfométricas durante a confecção do ROI para se guiar e manter um padrão.

A delimitação do ROI utilizada para possibilitar uma análise da região proximal e de furca do segundo molar superior foi, no sentido mesio-distal, a partir da raiz mesial do terceiro molar, até a raiz distal do primeiro molar, e no sentido cervico-apical, englobando todo o teto da furca do segundo molar superior até 500 μ m apical a esta estrutura. A escolha desta região de interesse se deu pelo local onde foram instaladas as ligaduras e aplicadas as injeções. O contorno em 2D do ROI foi desenhado em intervalos regulares, a cada 12 planos, a fim de diminuir o efeito da variabilidade do contorno das raízes, em seguida, um ROI em 3D foi criado utilizando o software (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium) baseando-se na resultante do contorno 2D. A partir disto, os parâmetros de fração do volume ósseo foram determinados e as análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado (Figura 7).

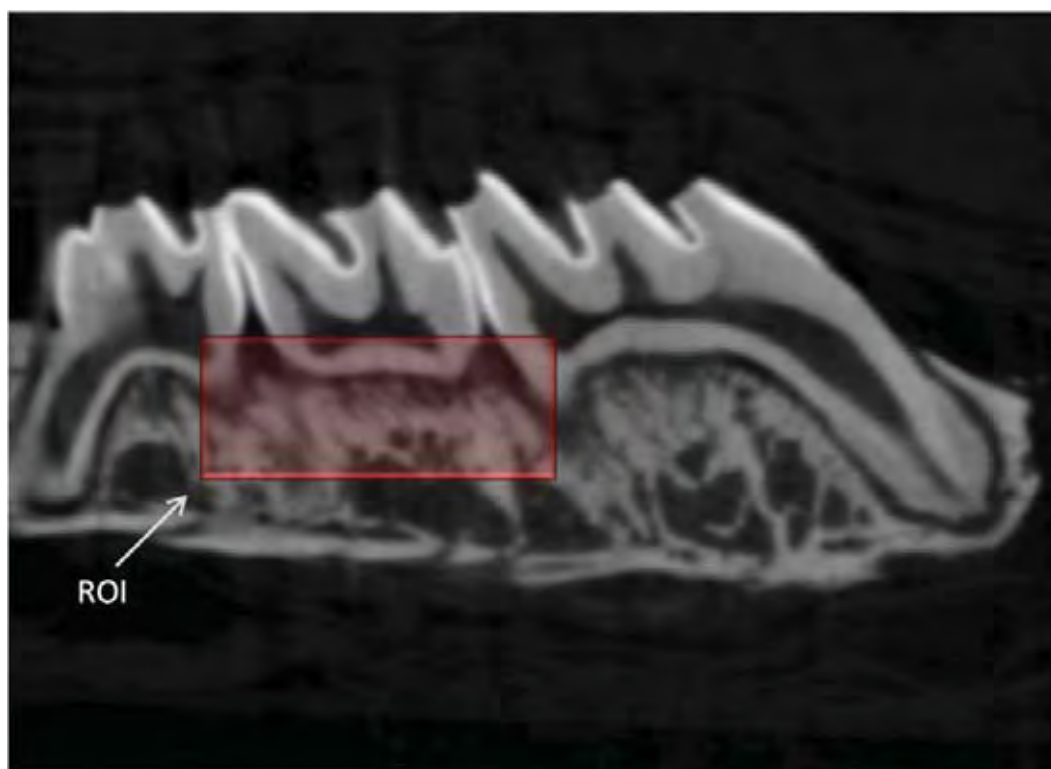


FIGURA 7 – Imagem do software CTAnalyser mostrando o ROI na posição padronizada para todas as imagens analisadas.

Análise Estatística

As comparações inter-grupos foram realizadas para as variáveis numéricas utilizando-se análise de variância de um critério (ANOVA), com pós-teste de *tukey*, ou o teste t de *student* para comparações em pares. Quando não houve homogeneidade de variâncias ou distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*, ou *Mann-Whitney* (pares). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os testes foram realizados utilizando-se software (Bioestat 5.0, Manuel Ayres, Belém, PA, Brasil) e o nível de significância adotado foi $p=0,05$.

RESULTADO

RESULTADO

Análise Histológica Descritiva

Controle

Os cortes transversais do segundo molar superior direito dos ratos do grupo controle apresentavam tecido gengival da face vestibular com sua porção bucal recoberta por epitélio pavimentoso estratificado paraceratinizado. A porção sulcular encontrava-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado não ceratinizado. Sua espessura apresentava número menor de células epiteliais quando comparado ao epitélio bucal. Em continuidade ao epitélio sulcular, observava-se o epitélio juncional, caracterizado por se apresentar com células epiteliais frouxamente arranjadas. O córion gengival subjacente ao epitélio caracterizava-se pela presença de tecido conjuntivo fibroso composto por densos feixes de fibras colágenas entremeado por fibroblastos fusiformes ou estrelados. Foi comum observar, mais precisamente próximo ao epitélio juncional, esparsas células mononucleares e de forma mais distribuída presença de figuras vasculares. Em continuidade ao tecido gengival observava-se osso alveolar envolvendo inúmeros osteócitos que se apresentavam com formato lenticular ou circular ocupando espaços naturalmente achatados denominados de lacunas, que por sua vez estavam envolvidas por matriz osteóide (não calcificada). Próximo à sua superfície observava-se células redondas e globosas caracterizando morfologicamente osteoblastos. Era possível observar em algumas áreas células com variados número de núcleos similares aos osteoclastos. Entre o tecido ósseo e

o cemento que recobria a superfície dentária havia o ligamento periodontal que apresentava figuras vasculares, feixes de fibras colágenas dispostas dentro da normalidade e inúmeras células fusiformes com características de fibroblastos (Figuras 8/A e 8/B).

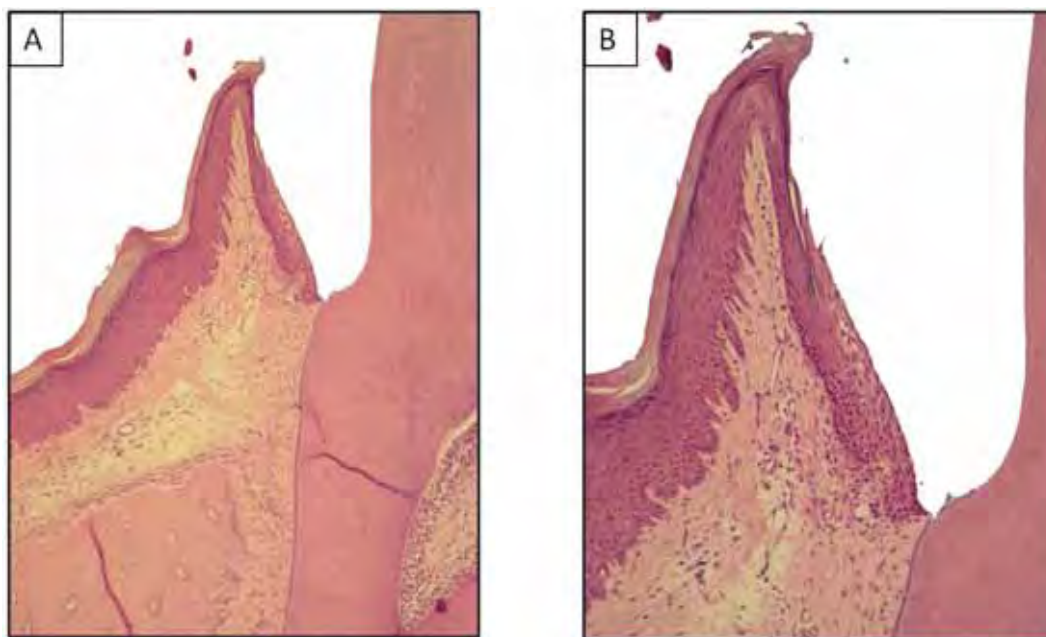


FIGURA 8 – Corte histológico de um animal do grupo Controle. **A)** Aumento de 10X; **B)** Aumento de 20X.

Doença Periodontal

Os cortes transversais do segundo molar superior direito dos ratos submetidos à indução da doença periodontal por ligadura e tratados com PBS apresentava gengiva da face vestibular com tecido epitelial desorganizado, desestruturado ou ausente, portanto não sendo possível diferenciar as porções bucal, sulcular e juncional principalmente no período de 14 dias (Figuras 9/C, 9/D, 9/E e 9/F). O córion gengival caracterizava-se por tecido conjuntivo desorganizado, compondo-se por feixes de fibras colágenas entremeadas por

escassos fibroblastos fusiformes ou estrelados e figuras vasculares. Após 7 dias da colocação da ligadura foi possível observar próximo a superfície, presença de intenso infiltrado inflamatório composto principalmente por células polimorfonucleares e figuras vasculares (Figuras 9/C e 9/D). Apesar da menor quantidade, os neutrófilos estavam presentes até o 14^o dia (Figuras 9/E e 9/F).

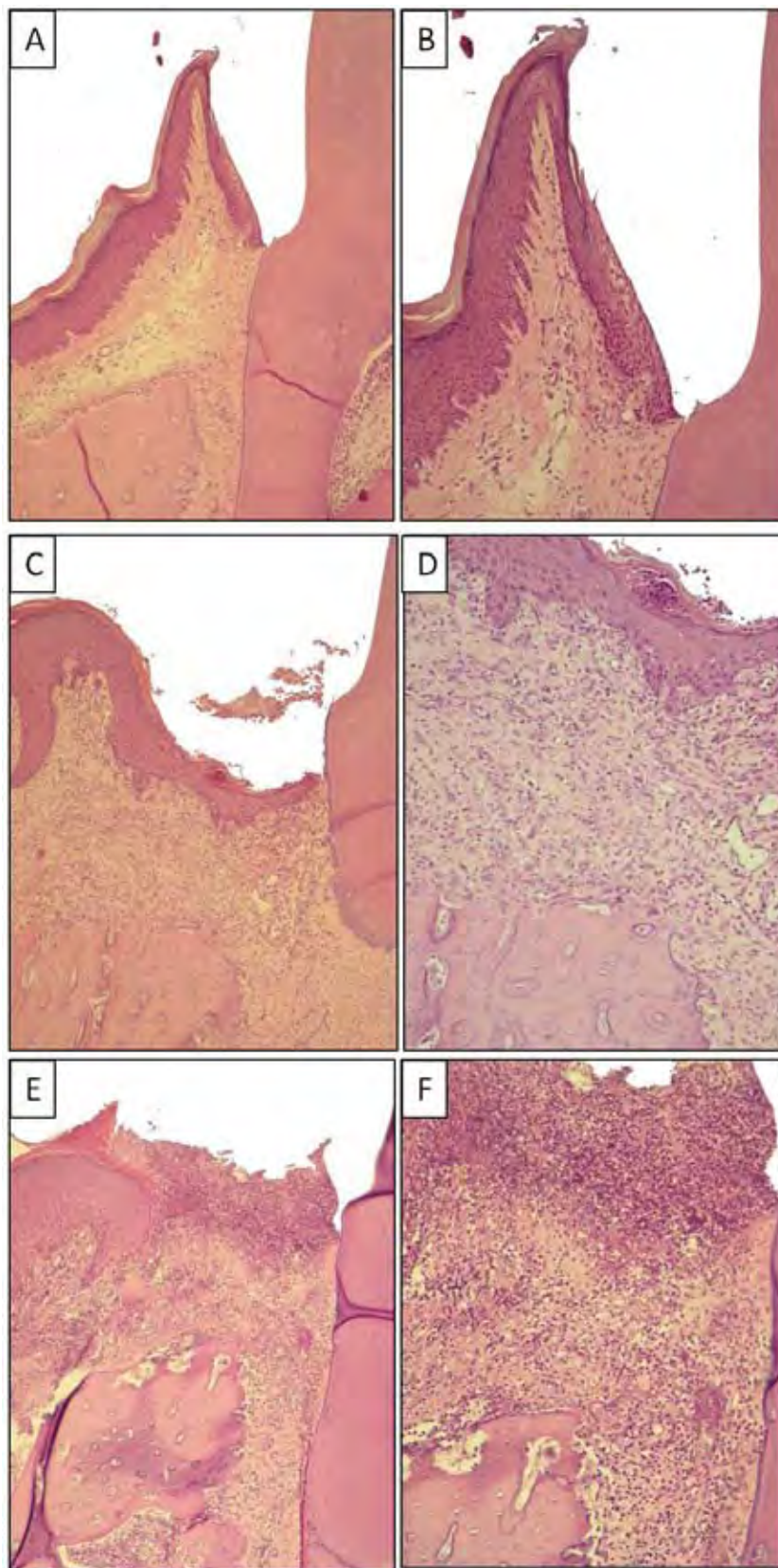


FIGURA 9 – Imagem dos cortes histológicos mostrando as diferenças estruturais nos grupos de indução de doença periodontal experimental e tratamento com PBS. **A)** Grupo 1 (Controle) no aumento de 10X; **B)** Grupo 1 no aumento de 20X; **C)** Grupo 2 (ligadura+PBS 7 dias) no aumento de 10X; **D)** Grupo 2 no aumento de 20X; **E)** Grupo 3 (ligadura+PBS 14 dias) no aumento de 10X; **F)** Grupo 3 no aumento de 20X.

Tanto no 7^o quanto no 14^o dias após a colocação da ligadura e tratamento com Parstatin, era possível observar que subjacente à área superficial havia mudança na composição do infiltrado inflamatório, isto é, havia presença de polimorfonucleares e mononucleares ocupando a mesma região, compondo um infiltrado inflamatório misto. Entretanto, a maioria das células dessa região era mononuclear. Observava-se abundância de figuras vasculares dilatadas (Figuras 10/C, 10/D, 10/E e 10/F).

Em continuidade ao tecido gengival observava-se o osso alveolar com extensas áreas de reabsorção vertical e horizontal principalmente no período de 14 dias, isto é, próximo a superfície do tecido ósseo observava-se reentrâncias ovóides algumas vezes ocupadas por osteoclastos. (Figuras 10/E e 10/F).

Entre o tecido ósseo e o cimento que recobria o dente havia o ligamento periodontal que apresentava figuras vasculares de diversos calibres, fibras colágenas e inúmeras células fusiformes (fibroblastos).

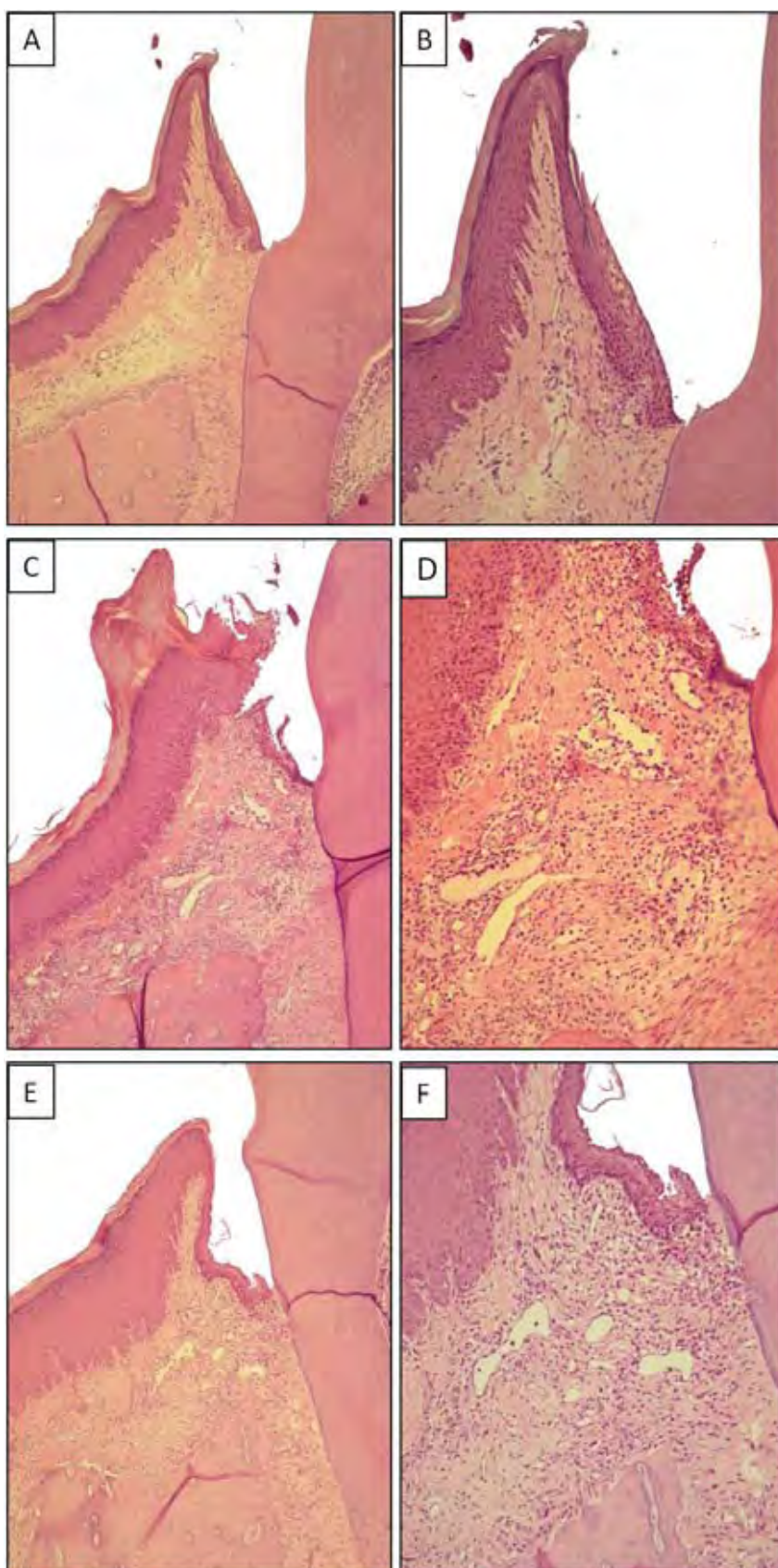


FIGURA 10 – Cortes histológicos mostrando as diferenças estruturais entre os grupos que receberam ligadura e tratamento com Parstatin. **A)** Grupo 1 (controle) no aumento de 10X; **B)** Grupo 1 no aumento de 20X; **C)** Grupo 4 (ligadura + Parstatin 7 dias) no aumento de 10X; **D)** Grupo 4 no aumento de 20X; **E)** Grupo 5 (ligadura + Parstatin 14 dias) no aumento de 10X; **F)** Grupo 5 no aumento de 20X.

Durante o período de reparação, os animais submetidos ao tratamento com PBS apresentavam características morfológicas do epitélio semelhantes às do controle. O córion gengival apresentava-se reparado, caracterizado por um aumento da quantidade de fibras colágenas (Figuras 11/C, 11/D, 11/E e 11/F). No grupo de animais submetidos ao tratamento com Parstatin, observava-se a persistência de discreto infiltrado inflamatório, caracterizado por células inflamatórias mononucleares. Nesses grupos observou-se abundantes figuras vasculares de grande calibre, sugerindo vasodilatação; Após 14 dias houve parcial reparação óssea vertical e horizontal, com o tecido ósseo caracterizado por apresentar grande quantidade de osteócitos em meio a uma matriz de organização definida. Porém, em ambos os grupos, o osso alveolar não retornou às configurações observadas no grupo da reparação tratado com solução de PBS. Havia pleno reparo do ligamento periodontal, com retorno da inserção das fibras entre o osso e o cimento (Figuras 12/C, 12/D, 12/E e 12/F).

Nos animais submetidos ao tratamento com Parstatin durante o período de reparo, observava-se ausência de reparação das porções epiteliais bucal, sulcular e juncional. O tecido epitelial apresentava-se desorganizado e desestruturado. As imagens sugeriam ausência de adesão de células do tecido epitelial. O córion gengival apresentava-se fibroso e era possível observar a persistência de células inflamatórias mononucleares entremeadas com grande quantidade de células fusiformes. Pequenas figuras vasculares eram observadas em abundância, caracterizando intensa angiogênese. Era possível observar reparação óssea vertical e horizontal, caracterizada por apresentar grande quantidade de osteócitos em meio a uma matriz de organização definida e inúmeras figuras vasculares.

Porém, o osso alveolar não retornou às configurações observadas no grupo de controle. Houve pleno reparo do ligamento periodontal, onde se observava retorno da inserção das fibras entre o osso e o cimento (Figuras 12/A, 12/B, 12/C, 12/D, 12/E e 12/F).

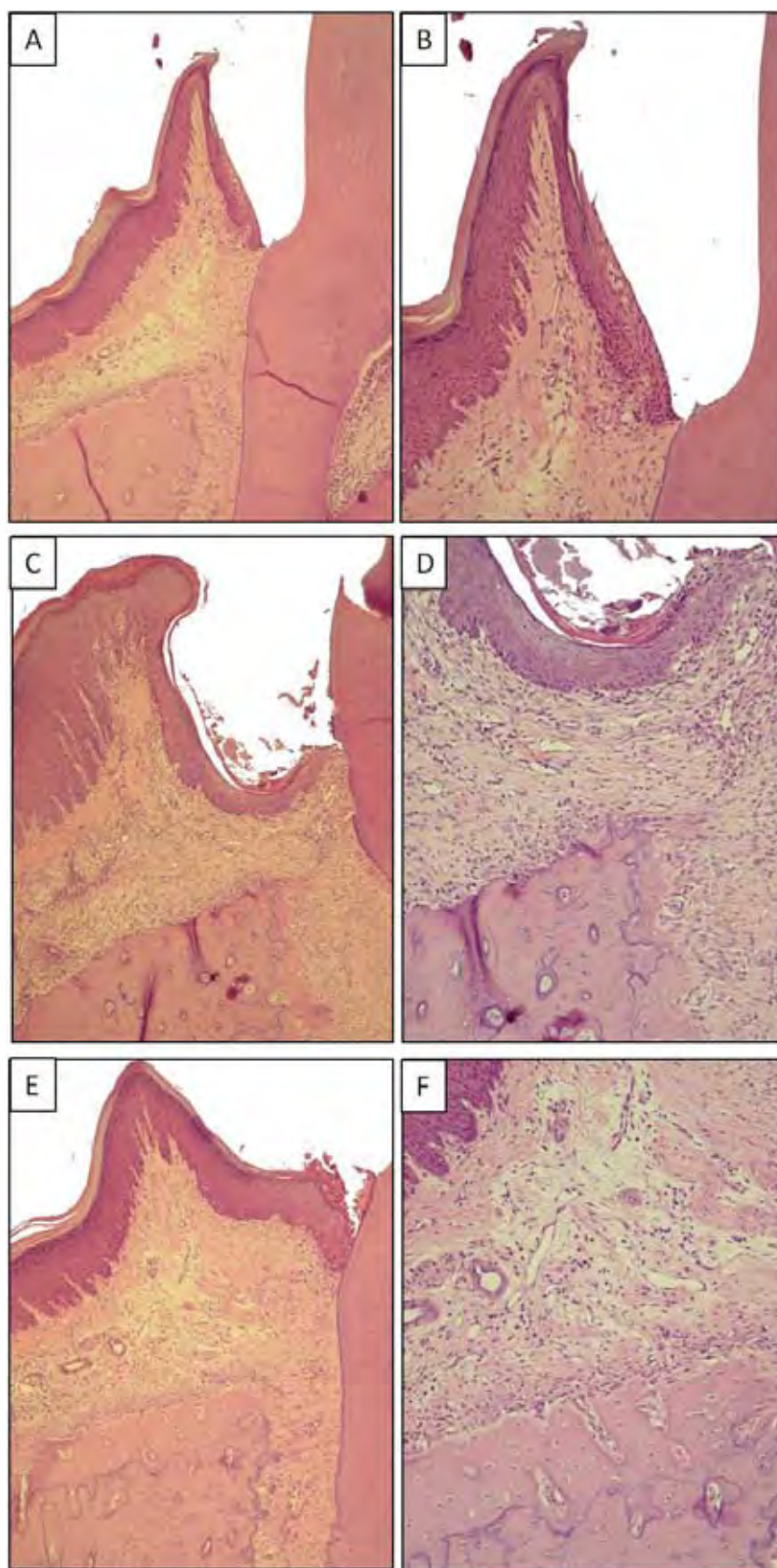


FIGURA 11 – Imagens dos cortes histológicos mostrando as diferenças estruturais nos grupos de reparo da doença periodontal experimental e tratamento com PBS. **A)** Grupo 1 (controle) no aumento de 10X; **B)** Grupo 1 no aumento de 20X; **C)** Grupo 6 (Reparo+PBS 24h) no aumento de 10X; **D)** Grupo 6 no aumento de 20X; **E)** Grupo 7 (Reparo+PBS 7 dias) no aumento de 10X; **F)** Grupo 7 no aumento de 20X.

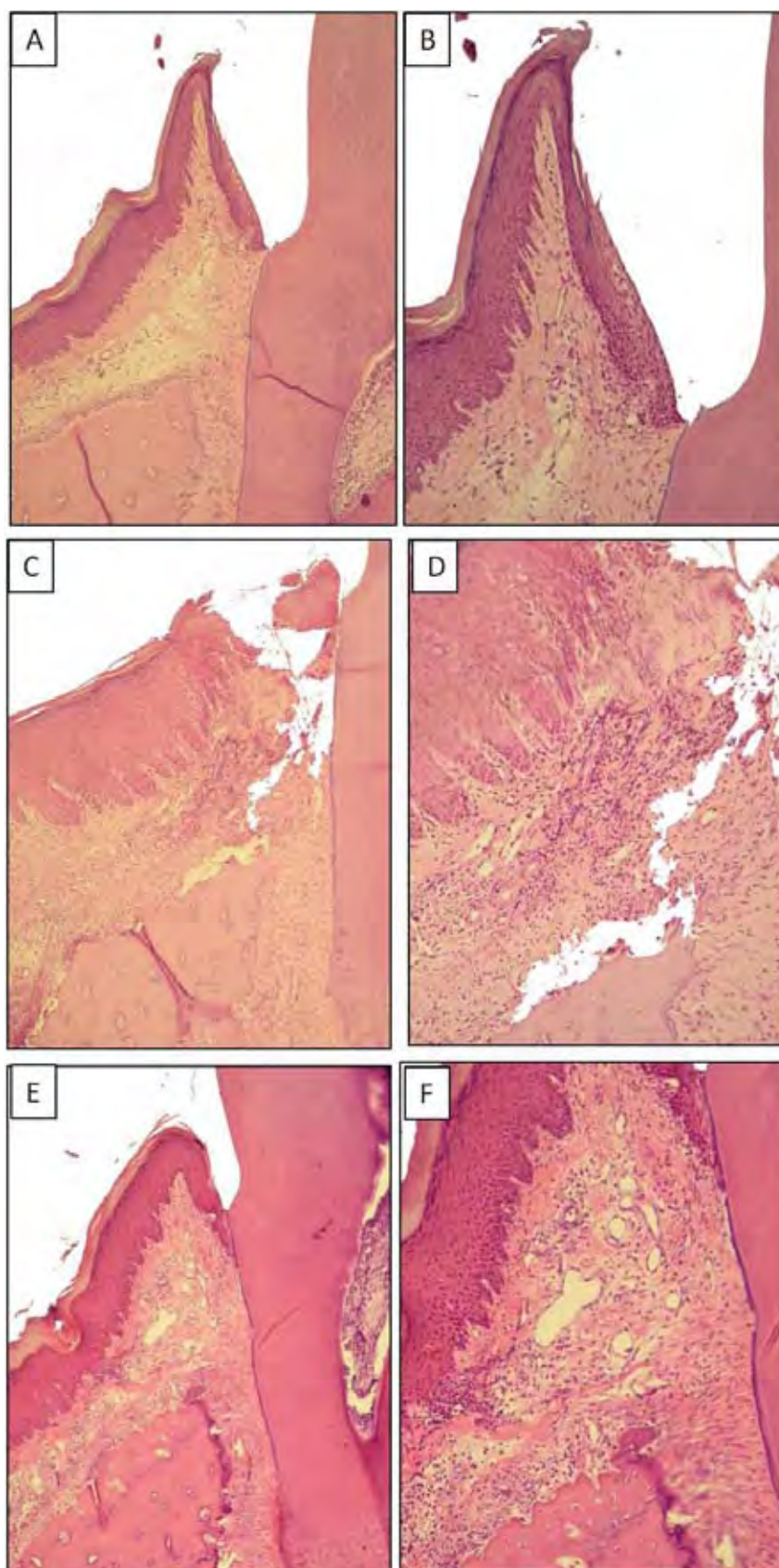


FIGURA 12 – Imagens dos cortes histológicos mostrando as diferenças estruturais nos grupos de reparo da doença periodontal experimental e tratamento com Parstatin. **A)** Grupo 1 (controle) no aumento de 10X; **B)** Grupo 1 no aumento de 20X; **C)** Grupo 6 (Reparo+Parstatin 24h) no aumento de 10X; **D)** Grupo 6 no aumento de 20X; **E)** Grupo 7 (Reparo+Parstatin 7 dias) no aumento de 10X; **F)** Grupo 7 no aumento de 20X.

Microtomografia Computadorizada - μ CT

Os resultados mostraram que houve diferença significativa nas áreas dos defeitos ósseos entre os grupos 1 e 2, e entre os grupos 1 e 4. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 4 (ANOVA; $p > 0,05$). O Gráfico 1 representa a média (\pm EPM) da área do defeito ósseo em mm^3 nas maxilas dos animais do grupo de controle (grupo 1), animais que receberam a ligadura e tratamento com PBS (grupo 2) ou Parstatin (grupo 4) no período de 7 dias.

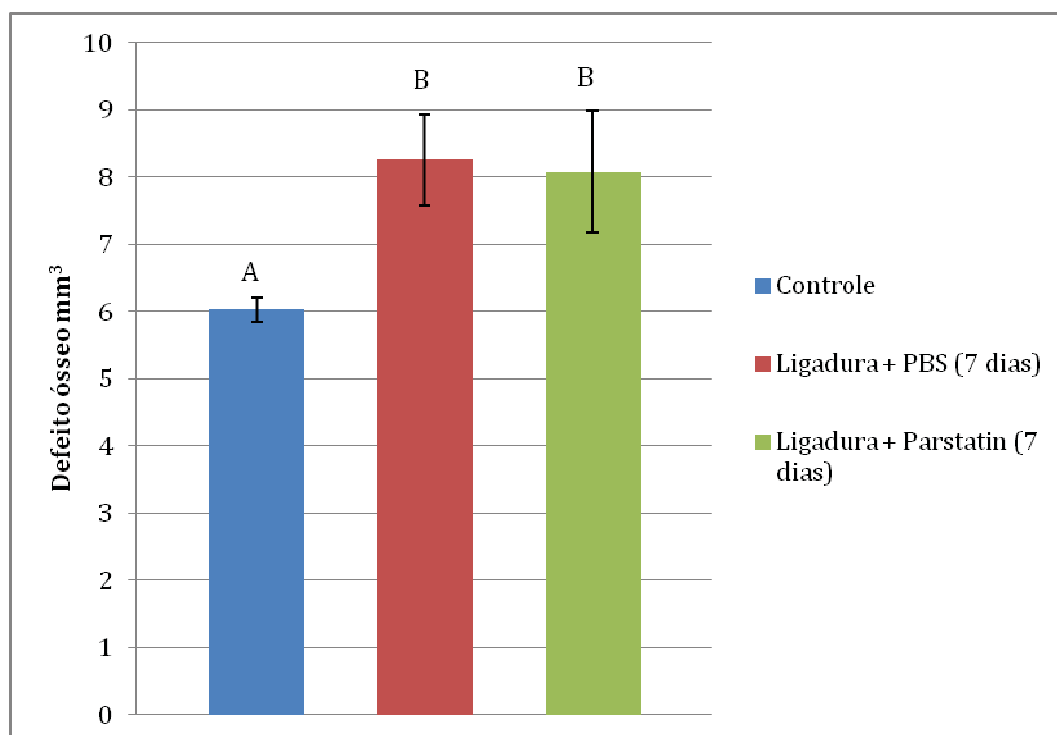


GRÁFICO 1 – Média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos gerados nos animais dos grupos 2 e 4 no período de 7 dias.*

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa

Nos grupos que receberam ligadura e tratamento com PBS (grupo 3) ou Parstatin (grupo 5) no período de 14 dias, houve diferença significativa apenas

entre os grupos 1 e 3, no entanto, entre os grupos 1 e 5 e entre os grupos 3 e 5 não houve diferença significativa (*Kuskall-Wallis*; $p > 0,05$). O Gráfico 2 mostra a média (\pm EPM) da área do defeito ósseo em mm^3 nas maxilas dos animais dos grupos 1, 3 e 5.

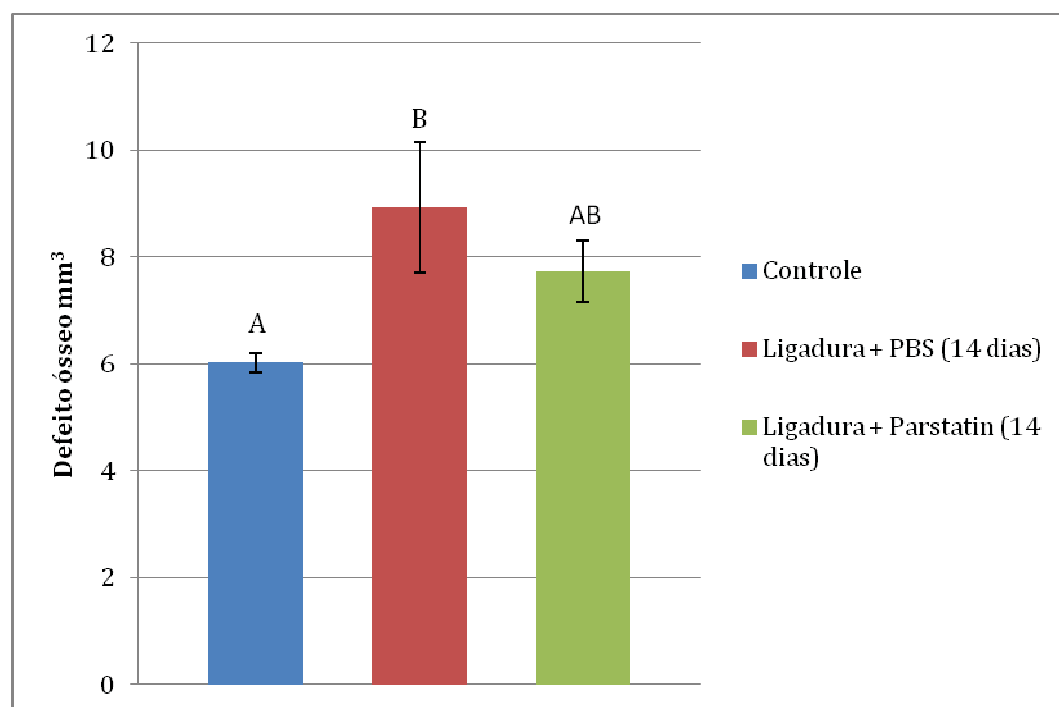


GRÁFICO 2 – Média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos gerados nos animais dos grupos 3 e 5 no período de 14 dias. *

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa.

Nos grupos de reparo, no período de 24 horas, houve diferença significativa entre as áreas dos defeitos ósseos dos grupos 1 e 6 (Teste *t* de student; $p < 0,05$) e dos grupos 1 e 8 (ANOVA; $p < 0,05$). O Gráfico 3 mostra a média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos em mm^3 dos grupos 1, 3 (Reparo + PBS 24h) e 5 (Reparo + Parstatin 24h).

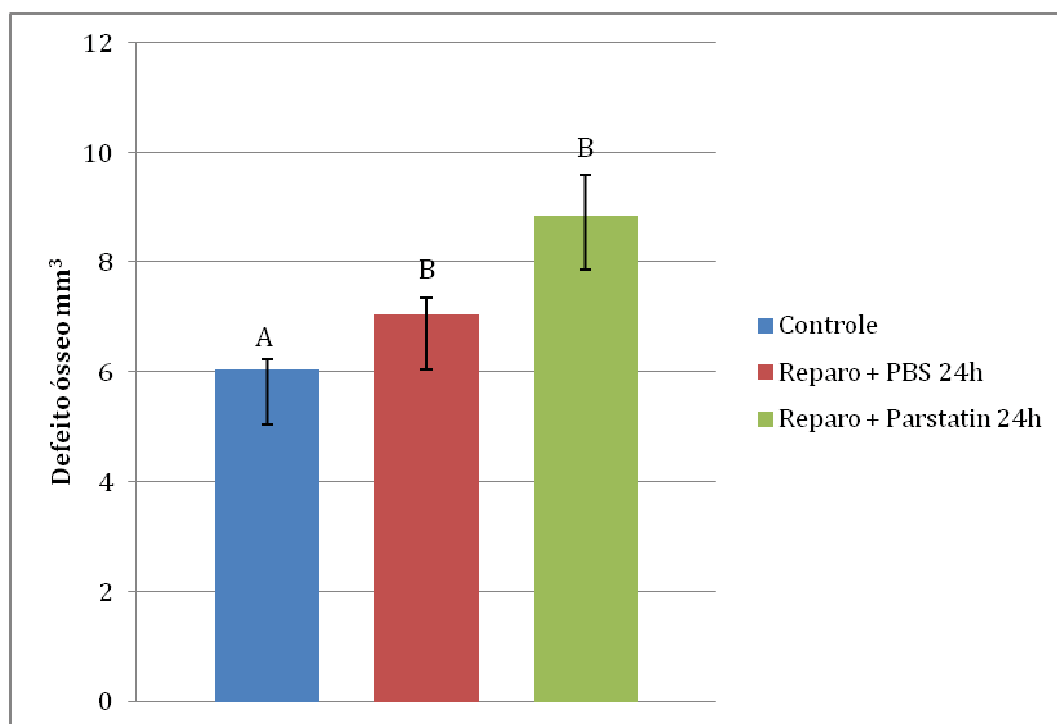


GRÁFICO 3 – Média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos gerados nos animais dos grupos 6 e 8 no período de reparo em 24h.*

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa.

Nos grupos de reparo no período de 7 dias, não houve diferença significativa entre as áreas de defeito ósseo entre nenhum dos grupos (ANOVA; $p > 0,05$). O Gráfico 4 mostra a média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos em mm^3 das maxilas dos animais dos grupos 1, 7 (Reparo + PBS 7 dias) e 9 (Reparo + Parstatin 7 dias).

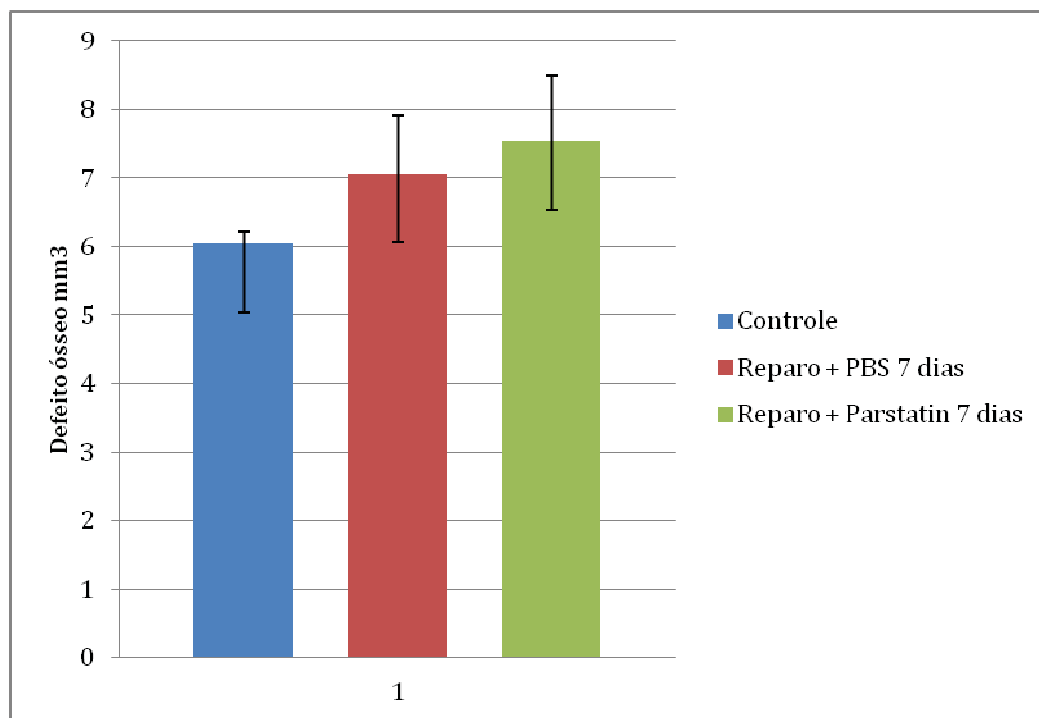


GRÁFICO 4 – Média (\pm EPM) das áreas dos defeitos ósseos gerados nos animais dos grupos 7 e 9 no período de reparo em 7 dias.

A Figura 11 mostra um esquema representativo da reconstrução dos modelos tomográficos tridimensionais dos grupos de indução da periodontite experimental.

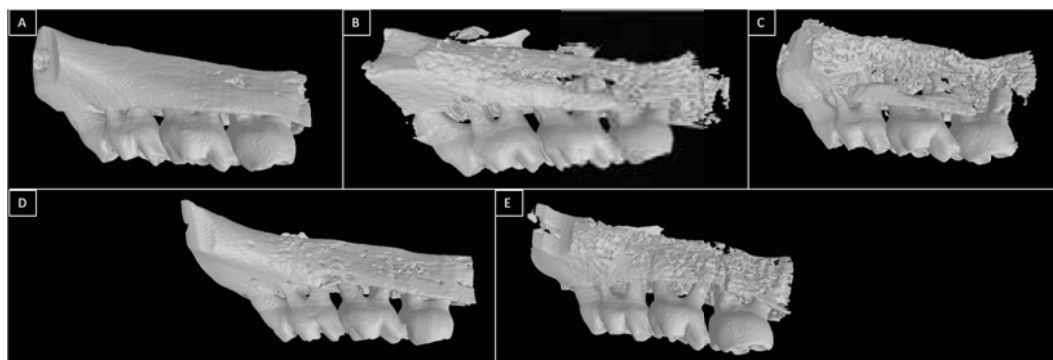


FIGURA 11 – Modelos 3D dos grupos de indução da periodontite experimental: A) Grupo 1; B) Grupo 2; C) Grupo 3; D) Grupo 4; E) Grupo 5.

A Figura 12 mostra um esquema representativo da reconstrução dos modelos tomográficos tridimensionais dos grupos de reparo da periodontite experimental.

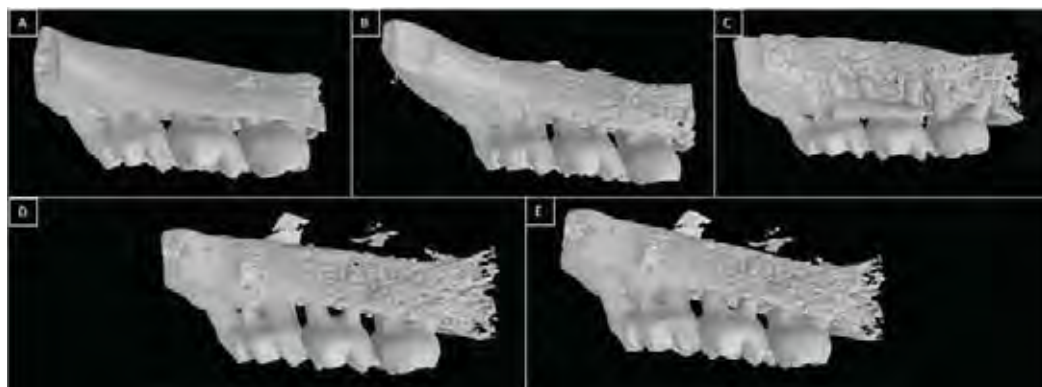


FIGURA 12 – Modelos 3D dos grupos de reparo da periodontite experimental: **A)** Grupo 1; **B)** Grupo 6; **C)** Grupo 7; **D)** Grupo 8; **E)** Grupo 9.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Angiogênese ou neovascularização é o processo pelo qual as células endoteliais secretam proteases que degradam a matriz extracelular, depois migram nos espaços perivasculares, proliferam e se alinham para formar novos vasos. É um processo crítico em alguns eventos fisiológicos assim como em alguns eventos patológicos incluindo as reações inflamatórias (Carmeliet⁵, 2003; Papetti, Herman³⁸, 2002; Conway et al.¹¹, 2001), câncer (Grandis, Argiris¹⁹, 2009) e em processos de reparo tecidual (Kobayashi, Lin²⁶, 2009). O aumento do número de vasos sanguíneos é uma das características clássicas da reação inflamatória fundamental para o aporte de células do sistema imune ao local da agressão. No processo de reparação, a angiogênese é fundamental por trazer nutrientes e mediadores biológicos para a modulação da atividade das células da área afetada, além de levar células mesenquimais que podem se diferenciar em diversos tipos celulares necessários ao reparo e regeneração dos tecidos afetados. Como o papel da angiogênese pode ser circunstancialmente interpretado como “desejável ou incentivado”, para que os novos meios de transporte do sangue possam colaborar na restauração da saúde (por ex., doenças neuro- degenerativas, no estabelecimento da resposta imune às infecções e na reparação de lesões isquêmicas do miocárdio, fraturas nos ossos) ou “indesejada” (por ex., no crescimento e invasão de tumores, obesidade, aterosclerose), diferentes abordagens terapêuticas estimulatórias ou inibitórias têm sido avaliadas. Existem diversos fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento

de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF) (Bao et al.³, 2009; Von Hundelshausen et al.⁴⁷, 2001; Maloney et al.³², 1998; Miyazono, Heldin³³, 1989; Linder et al.²⁷, 1979). Igualmente, fatores antiangiogênicos estão tendo relevância biológica e terapêutica como fatores importantes nos processos patológicos e fisiológicos (Folkman¹⁷, 2007). Inibidores endógenos da angiogênese incluem fatores de crescimento, citocinas, e metabolitos, assim como fragmentos de peptídeos que são derivados de tecido de remodelação (Ribatti⁴¹, 2009). Os mecanismos que regulam a angiogênese são extremamente complexos visto que há expansão de eclética classe de moléculas que agem como inibidores compreendendo não unicamente produtos decorrentes da expressão via genoma mas, em muitos casos, são derivados do próprio tecido como por exemplo fragmentos do tecido derivados da membrana basal como colágeno e proteoglicanos (Maeshima et al.³¹, 2000). Dada diversidade de moléculas que possuem atividade antiangiogênica, talvez não seja surpresa que uma proteína de superfície dê origem a um novo membro da classe de fragmentos de peptídeos anti-angiogênico. Parstatin é um novo membro dessa classe (Zania et al.⁴⁹, 2009). Uma variedade de proteases tem a habilidade de liberar Parstatin, incluindo trombina, proteína C reativa e MMP1. Portanto, a clivagem da porção N-terminal do PAR₁ por trombina gera um fragmento denominado Parstatin que pode penetrar na célula possivelmente através de um transportador ou por mediação lipídica inibindo a proliferação celular e causando apoptose (Duncan, Kalluri,¹⁵ 2009). Estudos mostraram que Parstatin, apresenta propriedades cardioprotetoras e é capaz de inibir a produção de VEGF e bFGF, ou seja, agindo

possivelmente como um inibidor do PAR₁ (Strande et al.⁴⁴, 2009; Zania et al.⁴⁹, 2009; Huang et al.²³, 2010; Routhu et al.⁴³, 2010). A partir dessas informações justifica-se o desenvolvimento do presente trabalho cujo objetivo foi avaliar o efeito do Parstatin, sobre a evolução e reparo da periodontite experimental em ratos.

No presente estudo, observou-se que os animais que receberam tratamento com Parstatin durante o processo de indução da doença periodontal experimental apresentaram um menor número de células inflamatórias quando comparados aos animais que receberam tratamento com PBS, possivelmente pela inibição na produção de VEGF, fundamental para o recrutamento leucocitário. Este efeito foi citado anteriormente por Huang et al.²³, 2010. Já nos grupos de reparo, o grupo que recebeu tratamento com Parstatin, tanto no período de 24 horas como no período de 7 dias, o infiltrado inflamatório pareceu persistir mais que nos grupos tratados com PBS. Estes resultados sugerem que o Parstatin atenua o processo inflamatório, porém, durante o processo de reparo esta droga não apresentou características benéficas.

Um achado interessante é a presença de vasos mais calibrosos, porém em menor número, nos grupos que receberam tratamento com Parstatin quando comparados aos grupos de controle, tanto durante o processo de indução quanto no processo de reparo da inflamação dos tecidos. Este efeito do Parstatin nos vasos foi citado anteriormente por Strande et al.⁴⁴, 2009 e por Routhu et al.⁴³, 2010. Estes resultados mostram que Parstatin atuou como protetor durante o processo de indução da inflamação, porém, nos grupos de reparo, Parstatin

mostrou piorar o quadro e manter o infiltrado inflamatório local. Para uma melhor análise destes resultados, análises de imuno-histoquímica seriam necessárias.

Quando analisamos os grupos de indução da doença periodontal experimental por μ CT, observamos que não houve diferença significativa em muitos dos grupos estudados, porém, assim como nos resultados das análises histológicas, o Parstatin atuou protegendo os tecidos durante o processo de indução da inflamação e no processo de reparo atuou retardando o mesmo. Não existem trabalhos que relacionam Parstatin com alterações nos tecidos ósseos.

São necessários mais estudos mostrando os efeitos de Parstatin nos tecidos ósseos para um melhor entendimento da ação desta droga nestes tecidos uma vez que só existem estudos relacionando Parstatin com angiogênese e cardioproteção. Análises moleculares e testes mais sensíveis são necessários para um melhor entendimento dos efeitos e mecanismos biológicos de Parstatin nos tecidos periodontais.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Apesar das limitações do presente estudo, concluiu-se que o Parstatin apresenta uma leve ação protetora durante a indução do processo inflamatório, demonstrada por sua capacidade de diminuir a quantidade de células inflamatórias no local. Porém, durante o reparo, Parstatin acaba por retardar este processo. Além disso, o efeito do Parstatin sobre o tecido ósseo periodontal demonstrou-se fraco.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 - Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *J Rheumatol.* 2011; 38: 911-20.
- 2 – Andrade-Gordon P, Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Addo MF, Cheung Wm, et al. Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 34-42.
- 3 – Bao J, Wu ZS, Qi Y, WU Q, Yang F. Expression of TGF-beta1 and de mechanism of invasiveness and metastasis induced by TGF-beta1 in breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2009; 31: 679-82.
- 4 - Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2000; 71: 1009-14.
- 5 – Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-60.
- 6 – Chen D, Carpenter A, Abrahams J, Chambers RC, Lechler RI, McVey JH, et al. Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leucocyte recruitment in vivo. *J Exp Med.* 2008; 205: 1739-46.
- 7 – Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, WallaceJL, Hollemberg MD, Buret AG. Proteinase-activated receptor-1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(19): 11104-9.

*De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements>.

- 8 - Chiu LL, Perng DW, Yu CH, SU SN, Chow LP. Mold allergen, pen C 13, induces IL-8 expression in human airway epithelial cells by activating protease-activated receptor 1 and 2. *J Immunol.* 2007; 178: 5237-44.
- 9 - Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries or inflammation?. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 103-8.
- 10 - Coimbra LS, Rossa C Jr, Guimarães MR, Gerlach RF, Muscará MN, Spolidorio DM, et al. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *J Periodontol.* 2011; 82: 767-77.
- 11 – Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessels growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 507-21.
- 12 – Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(20): 11023-7.
- 13 - Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000; 407(6801): 258-64.
- 14 – Derian CK, Damiano BP, Addo MF, Darrow AL, D'Andrea MR, Nedelman N, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304: 855-61.
- 15 - Duncan MB, Kalluri R. Parstatin, a novel protease-activated receptor 1-derived inhibitor of angiogenesis. *Mol Interv.* 2009; 9: 168-70.
- 16 – Fälker K, Haglund L, Gunnarson P, Nylander M, Lindahl TL, Grenegard M. Proteinase-activated receptor 1 (PAR1) signaling desensitization is counteracted via PAR4 signaling in human platelets. *Biochem J.* 2011; 436:469-80.
- 17 - Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg.* 2007; 42: 1-11.

- 18 - Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J.* 1996; 313: 353-68.
- 19 – Grandis JR, Argiris A. Targeting angiogenesis from premalignancy to metastasis. *Cancer Prev Res.* 2009; 2: 291-4.
- 20 - Guimarães MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C JR, et al. Protective effects of tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 882-8.
- 21 - Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 208-11.
- 22 – Hou L, Ravenall S, Macey MG, Hariott P, Kapas S, Howells GL. Protease-activated receptors and their role in IL-6 and NF-IL-6 expression in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1998; 33: 205-11.
- 23 - Huang H. Parstatin suppresses ocular neovascularization and inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 5825-32.
- 24 - Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res.* 1975; 10: 332-45.
- 25 – Kawabata A, Kuroda R, Nagata N, Kawao N, Masuko T, Nishikawa H, et al. In vivo evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse. *Br J Pharmacol.* 2001; 133: 1213-8.
- 26 – Kobayashi H, Lin PC. Angiogenesis links chronic inflammation with cancer. *Methods Mol Biol.* 2009; 511: 185-91.

- 27 – Linder BL, Chernoff A, Kaplan KL, Goodman DS. Release of platelet-derived growth factor from human platelets by arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4107-11.
- 28 – Loubakos A, Potempa J, Travis J, D’Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, et al. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*. 2001; 69: 5121-30.
- 29 - Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 63-72.
- 30 - Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 245-82.
- 31 – Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JÁ, Ericksen MB, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*. 2000; 275(28): 21340-8.
- 32 – Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol*. 1998; 275: H1054-61.
- 33 – Miyazono K, Heldin CH. High-yield purification of platelet-derived endothelial cell growth factor: structural characterization and establishment of a specific antiserum. *Biochemistry*. 1989; 28: 1704-10.

- 34 - Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscará MN et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 479-88.
- 35 - Nieman MT. Protease-activated receptor 4 uses anionic residues to interact with alpha-thrombin in the absence or presence of protease-activated receptor 1. *Biochemistry.* 2008; 47(50): 13279-86.
- 36 - O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene.* 2001; 20(13): 1570-81.
- 37 - Ossovskaya VS, Brunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84: 579-621.
- 38 - Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282: C497-70.
- 39- Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss repair. *J Periodontol.* 2007; 78: 273-81.
- 40 - Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinase and signaling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 (suppl 1): S263-82.
- 41 - Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res.* 2009; 33: 638-44.
- 42 - Rohani MG, DiJulio DH, An JY, Hacker BM, Dale BA, Chung WO. PAR1- and PAR2-induced innate immune markers are negatively regulated by PI3K/Akt signaling pathway in oral keratinocytes. *BMC Immunol.* 2010; 11: 53.

- 43 - Routhu KV, Tsopanoglou NE, Strande JL. Parstatin(1-26): the putative signal peptide of protease-activated receptor 1 confers potent protection from myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332: 898-905.
- 44 - Strande JL, Widlansky ME, Tsopanoglou NE, Su J, Wang J, Hsu A, Routhu KV, Baker JE. Parstatin: a cryptic peptide involved in cardioprotection after ischaemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328: 378-89.
- 45 – Veiga Cde S, Carneiro-Lobo TC, Coelho CJ, Carvalho SM, Maia RC, Vasconcelos FC, et al. Increased expression of protease-activated receptor 1 (PAR-1) in human leukemias. *Blood Cells Mol Dis.* 2011; 46: 230-4.
- 46 – Vergnolle N, Hollemberg MD, Wallace JL. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *Br J Pharmacol.* 1999; 126: 1262-8.
- 47 - Von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 2001; 103(13): 1772-7.
- 48 – Wee JL, Chionh YT, NG GZ, Harbour SN, Allison C, Pagen CN et al. Protease-activated receptor-1 down-regulates the murine inflammatory and humoral response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2010; 138: 573-82.
- 49 - Zania P, Gourni D, Aplin AC, Nicosia RF, Flordellis CS, Maragoudakis ME et al. Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328: 378-89.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Várzea Paulista



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 20/2011

Araçatuba, 08 de Fevereiro de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 07/02/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação da inibição do PAR-1 por parstatin sobre a evolução e reparo da periodontite experimental em ratos" (Proc. CEUA nº 20/2011) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para ABRIL/2012 (esta data foi calculada em função daquilo que consta inicialmente no formulário).

Esta aprovação contém a seguinte recomendação feita por um dos Relatores e aprovada pela CEUA, que deverá ser cumprida por Vossa Senhoria: "O pesquisador entregou uma carta com os esclarecimentos necessários; no entanto, sugiro ao CEUA que solicite ao pesquisador que adicione as informações que constam na carta do pesquisador encaminhada ao CEUA no Formulário. O pesquisador deve também corrigir a data de término da pesquisa; no formulário do CEUA consta que o término da pesquisa será 03/12."

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI

Vice-Coordenador no exercício da Coordenadoria da CEUA

Ao

Prof. Dr. LUÍS CARLOS SPOLIDÓRIO

DD. Pesquisador Responsável

Departamento de Fisiologia e Patologia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de março de 2012

PABLO DALLARI RAMALHO LUCAS